John W Baynes
Marek H Dominiczak



TRADUÇÃO DA 4ª EDIÇÃO

Bioquímica MÉDICA



SAUNDERS
ELSEVIER

Bioquímica Médica

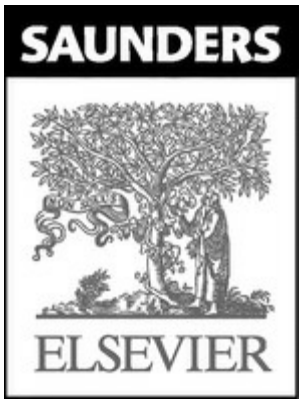
QUARTA EDIÇÃO

John W. Baynes, PhD

Carolina Distinguished Professor Emeritus
Department of Pharmacology, Physiology and Neuroscience
University of South Carolina School of Medicine
Columbia, South Carolina
USA

Marek H. Dominiczak, MD Dr Hab Med FRCPath FRCP (Glas)

Hon Professor of Clinical Biochemistry and Medical Humanities
College of Medical, Veterinary and Life Sciences
University of Glasgow
United Kingdom
Docent in Laboratory Medicine
University of Turku, Finland
Consultant Biochemist
Clinical Biochemistry Service
National Health Service (NHS) Greater Glasgow and Clyde,
Gartnavel General Hospital
Glasgow
United Kingdom


SAUNDERS
ELSEVIER

Sumário

Instruções para acesso on-line

Capa

Folha de rosto

Copyright

Revisão Científica e Tradução

Prefácio

Colaboradores

Dedicatória

Agradecimentos

Abreviaturas

Capítulo 1: Introdução

- Bioquímica e medicina clínica
- Bioquímica em duas páginas
- O que este livro é – e o que não é

Capítulo 2: Aminoácidos e Proteínas

Introdução

Aminoácidos

Tampões

Peptídios e proteínas

Purificação e caracterização das proteínas

Análise da estrutura das proteínas

Resumo

Capítulo 3: Carboidratos e Lipídios

Introdução

Carboidratos

Lipídios

Estrutura das membranas biológicas

Resumo

Capítulo 4: Sangue: Células e Proteínas Plasmáticas

Introdução

Elementos figurados do sangue

Proteínas plasmáticas

A resposta de fase aguda e proteína c reativa

Testes clínicos: biomarcadores

Resumo

Capítulo 5: Transporte de Oxigênio

Introdução

Características das proteínas globinas de mamíferos

Modulação alostérica da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio

Tópicos selecionados

Resumo

Capítulo 6: Proteínas Catalisadoras – Enzimas

Introdução

Reações enzimáticas

Cinética enzimática

Mecanismos de ação das enzimas

Inibição enzimática

Regulação da atividade enzimática

Medida enzimática da glicose no sangue

Resumo

Capítulo 7: Hemostasia e Trombose

Introdução

Hemostasia

A parede do vaso

Plaquetas e distúrbios de sangramento relacionados com as plaquetas

Coagulação

Fibrinólise

Resumo

Capítulo 8: Membranas e Transporte

Introdução

Tipos de processos de transporte

Resumo

Capítulo 9: Bioenergética e Metabolismo Oxidativo

Introdução

Oxidação como fonte de energia

Energia livre

Conservação de energia pelo acoplamento com a adenosina trifosfato

Síntese mitocondrial de trifosfato de adenosina a partir de coenzimas reduzidas

O sistema mitocondrial de transporte de elétrons

Transferência de elétrons do nadh para a mitocôndria

Síntese de adenosina trifosfato – a hipótese quimiostática

Inibidores do metabolismo oxidativo

Regulação da fosforilação oxidativa

Resumo

Capítulo 10: Digestão e Absorção de Nutrientes: o Trato Gastrintestinal

Introdução

Processamento de água e de eletrólitos no trato gastrintestinal

Digestão

Digestão e absorção de carboidratos

Digestão e absorção de lipídios

Digestão e absorção de proteínas

Resumo

Capítulo 11: Vitaminas e Minerais

Introdução

Vitaminas lipossolúveis: A, D, E, K

Vitaminas hidrossolúveis B, C

Minerais

Oligoelementos

Resumo

Capítulo 12: Metabolismo Anaeróbico da Glicose nos Eritrócitos

Introdução

O eritrócito

Glicólise

Síntese de 2,3-bisfosfoglicerato (2,3-BPG)

A via das pentoses fosfato

O estágio redox da via das pentoses fosfato síntese de nadph

Resumo

Capítulo 13: Armazenamento e Síntese de Carboidratos no Fígado e no Músculo

Introdução

Estrutura do glicogênio

Via de glicogênese a partir da glicose sanguínea no fígado

Via da glicogenólise no fígado

Regulação hormonal da glicogenólise hepática

Mecanismo de ação do glucagon

Mobilização do glicogênio hepático pela epinefrina

Glicogenólise no músculo

Regulação da glicogênese

Gliconeogênese

Resumo

Capítulo 14: O Ciclo do Ácido Tricarboxílico

Introdução

Funções do ciclo do ácido tricarboxílico

Piruvato carboxilase

O complexo piruvato desidrogenase

Enzimas e reações do ciclo do ácido tricarboxílico

O Rendimento energético do ciclo do ácido tricarboxílico

Reações anapleróticas (“preenchimento”)

Regulação do ciclo do ácido tricarboxílico

Resumo

Capítulo 15: Metabolismo Oxidativo de Lipídios no Fígado e no Músculo

Introdução

Ativação de ácidos graxos e seu transporte para a mitocôndria

Oxidação de ácidos graxos

Cetogênese – uma via metabólica exclusiva do fígado

Resumo

Capítulo 16: Biossíntese e Armazenamento de Ácidos Graxos

Introdução

Síntese de ácido graxo

Alongamento do ácido graxo

Dessaturação de ácidos graxos

Ácidos graxos essenciais

Armazenamento e transporte de ácidos graxos: a síntese de triacilgliceróis

Regulação dos estoques de gordura corporal total

Resumo

Capítulo 17: Biossíntese de Colesterol e Esteroides

Introdução

A Molécula de colesterol

Colesterol livre e esterificado

Absorção intestinal de colesterol

Biossíntese de colesterol

Ácidos biliares

Hormônios esteroides

Vitamina D3

Resumo

Capítulo 18: Metabolismo de Lipoproteínas e Aterogênese

Introdução

Lipoproteínas

Receptores de lipoproteínas

Enzimas e proteínas de transferência de lipídios

Vias do metabolismo de lipoproteínas

Dislipidemias

Aterosclerose, aterogênese e aterotrombose

Avaliação do risco cardiovascular

Resumo

Capítulo 19: Biossíntese e Degradação de Aminoácidos

Introdução

Metabolismo das proteínas da dieta e endógenas

Degradação de aminoácidos

Metabolismo dos esqueletos de carbono dos aminoácidos

Biossíntese de aminoácidos

Doenças hereditárias do metabolismo de aminoácidos

Resumo

Capítulo 20: Músculo: Metabolismo Energético e Contração

Introdução

Estrutura muscular

O processo de contração

Metabolismo energético do músculo

Engenharia de tecidos e substituição do músculo

Efeito do exercício

Resumo

Capítulo 21: Homeostasia da Glicose e Metabolismo Energético: Diabetes Melito

Introdução

Insulina

O ciclo alimentação-jejum

Metabolismo durante o estresse

Diabetes melito

Hipoglicemia

Avaliação laboratorial do metabolismo energético

Tratamento do diabetes

Resumo

Capítulo 22: Nutrição e Balanço Energético

Introdução

Regulação da ingestão alimentar

Regulação do balanço energético

Nutrigenômica

Principais classes de nutrientes

Definições na ciência nutricional

Nutrientes essenciais (limitantes)

Avaliação do estado nutricional

Desnutrição

Obesidade

Alimentação saudável e prevenção dietética da doença

Resumo

Capítulo 23: O Papel dos Rins no Metabolismo

Introdução

Avaliação da função renal

Resumo

Capítulo 24: Homeostase da Água e de Eletrólitos

Introdução

Compartimentos hídricos do corpo

Osmolalidade: pressões osmótica e oncótica

Potássio

Sistema renina-angiotensina

Integração da homeostase da água e do sódio

Resumo

Capítulo 25: Regulação da Concentração do Íon Hidrogênio (equilíbrio acidobásico)

Introdução

Os sistemas-tampão corporais: os componentes respiratório e metabólico do equilíbrio acidobásico

Pulmões: a troca gasosa

Transporte de bicarbonato pelos rins

Distúrbios do equilíbrio acidobásico

Resumo

Capítulo 26: Metabolismo do Osso e Homeostase do Cálcio

Introdução

Estrutura óssea e remodelamento ósseo

Homeostase do cálcio

Distúrbios do metabolismo do cálcio

Doença metabólica óssea

Resumo

Capítulo 27: Carboidratos Complexos: Glicoproteínas

Introdução

Estruturas e Ligações

Interconversões dos açúcares da dieta

Outras vias do metabolismo de açúcares nucleotídios

Biossíntese de oligossacarídios

Funções das cadeias de oligossacarídios das glicoproteínas

Resumo

Capítulo 28: Lipídios Complexos

Introdução

Síntese e turnover de glicerofosfolipídios

Esfingolipídios

Doenças do armazenamento lisossomal resultante de defeito na degradação de glicolipídios

Antígenos do grupo sanguíneo ABO

Outras substâncias dos grupos sanguíneos

Resumo

Capítulo 29: A Matriz Extracelular

Introdução

Colágenos

Proteínas não colagenosas na matriz extracelular

Proteoglicanos

Comunicação das células com a matriz extracelular

Resumo

Capítulo 30: Papel do Fígado no Metabolismo

Introdução

Estrutura do fígado

Fígado e metabolismo de carboidratos

Fígado e metabolismo proteico

Síntese do heme

Metabolismo da bilirrubina

Metabolismo de fármacos

Farmacogenômica

Testes bioquímicos de função hepática

Classificação de distúrbios hepáticos

Genômica de doenças hepáticas

Resumo

Capítulo 31: Biossíntese e Degradação de Nucleotídios

Introdução

Metabolismo das purinas

Metabolismo das pirimidinas

Formação de desoxinucleotídios

Resumo

Capítulo 32: Ácido Desoxirribonucleico

Introdução

Estrutura do ácido desoxirribonucleico

O ciclo celular em eucariotos

Replicação do DNA

Reparo do DNA

Resumo

Capítulo 33: Ácido Ribonucleico

Introdução

Anatomia molecular de moléculas de ácido ribonucleico

Polimerases de ácido ribonucleico

Ácido ribonucleico mensageiro: transcrição

Processamento pós-transcricional de ácidos ribonucleicos

Degradação ou inativação seletiva do ácido ribonucleico

Resumo

Capítulo 34: Síntese e Reciclagem de Proteínas

Introdução

O código genético

A maquinaria de síntese proteica

O processo da síntese proteica

Enovelamento proteico e estresse do retículo endoplasmático (RE)

Direcionamento de proteínas e modificações pós-traducionais

Resumo

Capítulo 35: Regulação da Expressão Gênica: Mecanismos Básicos

Introdução

Mecanismos básicos da expressão gênica

Receptores de esteroides

Estratégias alternativas de regulação gênica em seres humanos

Resumo

Capítulo 36: Regulação da Expressão Gênica: Genômica, Proteômica e Metabolômica

Introdução

Genômica

Proteômica

Metabolômica

Resumo

Capítulo 37: Oxigênio e Vida

Introdução

A Não reatividade do oxigênio

Espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo

Espécies reativas de nitrogênio e estresse nitrosativo

A Natureza do dano causado por radicais de oxigênio

Defesas antioxidantes

Os efeitos benéficos das espécies reativas de oxigênio

Resumo

Capítulo 38: A Resposta Imune

Introdução

Resposta imune inata

Resposta imune adaptativa

Linfócitos T e B

Moléculas envolvidas no reconhecimento antigênico

Complexo principal de histocompatibilidade

Tecidos linfoides

Células apresentadoras de antígenos

Reação, resposta e eliminação dos antígenos

A resposta das células T

A resposta imune humoral adaptativa

Vacinação

Resumo

Capítulo 39: Endocrinologia Bioquímica

Introdução

Hormônios

Princípios da ação hormonal

Avaliação bioquímica da ação hormonal

Principais tipos de patologia endócrina

O Sistema regulador hipotálamo-pituitária

O Eixo hipotálamo-pituitária-tireoide

O Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal

O Eixo hipotálamo-pituitária-gônadas

O Eixo do hormônio do crescimento

O Eixo da prolactina

Resumo

Capítulo 40: Receptores de Membrana e Transdução de Sinal

Introdução

Tipos de receptores de hormônios e de monoaminas

Acoplamento de receptores à transdução de sinal intracelular

Segundos mensageiros

Resumo

Capítulo 41.1: Neurotransmissores

Introdução

Definição de neurotransmissor

Classificação dos neurotransmissores

Neurotransmissão

Classes de neurotransmissores

Resumo

Capítulo 41.2: Neuroquímica

Introdução

O encéfalo e os nervos periféricos

As células do sistema nervoso

Transmissão sináptica

O mecanismo da visão

Resumo

Capítulo 42: Homeostasia Celular: Crescimento Celular e Câncer

Introdução

Ciclo celular

Regulação do ciclo celular

Morte celular

Resumo

Capítulo 43: Envelhecimento

Introdução

Teorias do envelhecimento

Modelos genéticos de aumento da expectativa de vida

Intervenções antienvelhecimento – o que funciona e o que não funciona

Resumo

Apéndice 1: Intervalos de Referência Laboratoriais Clínicos Selecionados

Apéndice 2: Os Fundamentos da Tecnologia do DNA Recombinante: Hibridização Molecular e Clonagem de DNA

Índice

Copyright

© 2015 Elsevier Editora Ltda.
Tradução autorizada do idioma inglês da edição publicada por Saunders – um selo editorial Elsevier Limited.
Todos os direitos reservados e protegidos pela Lei 9.610 de 19/02/1998.
Nenhuma parte deste livro, sem autorização prévia por escrito da editora, poderá ser reproduzida ou transmitida sejam quais forem os meios empregados: eletrônicos, mecânicos, fotográficos, gravação ou quaisquer outros.
ISBN: 978-85-352-7903-0
ISBN (versão eletrônica): 978-85-352-8287-0

Copyright © 2014, Elsevier Limited. All rights reserved.
This edition of Medical Biochemistry by [John W. Baynes is published by arrangement with Elsevier Limited.
ISBN: 978-1-4557-4581-4

Capa
Studio CreamCrackers

Editoração Eletrônica
Thomson Digital

Elsevier Editora Ltda.

Conhecimento sem Fronteiras
Rua Sete de Setembro, n° 111 – 16° andar
20050-006 – Centro – Rio de Janeiro – RJ
Rua Quintana, n° 753 – 8° andar
04569-011 – Brooklin – São Paulo – SP
Serviço de Atendimento ao Cliente
0800 026 53 40
atendimento1@elsevier.com
Consulte nosso catálogo completo, os últimos lançamentos e os serviços exclusivos no site www.elsevier.com.br

Nota

Como as novas pesquisas e a experiência ampliam o nosso conhecimento, pode haver necessidade de alteração dos métodos de pesquisa, das práticas profissionais ou do tratamento médico. Tanto médicos quanto pesquisadores devem sempre basear-se em sua própria experiência e conhecimento para avaliar e empregar quaisquer informações, métodos, substâncias ou experimentos descritos neste texto. Ao utilizar qualquer informação ou método, devem ser criteriosos com relação a sua própria segurança ou a segurança de outras pessoas, incluindo aquelas sobre as quais tenham responsabilidade profissional.

Com relação a qualquer fármaco ou produto farmacêutico especificado, aconselha-se o leitor a cercar-se da mais atual informação fornecida (i) a respeito dos procedimentos descritos, ou (ii) pelo fabricante de cada produto a ser administrado, de modo a certificar-se sobre a dose recomendada ou a fórmula, o método e a duração da administração, e as contraindicações. É responsabilidade do médico, com base em sua experiência pessoal e no conhecimento de seus pacientes, determinar as posologias e o melhor tratamento para cada paciente individualmente, e adotar todas as precauções de segurança apropriadas.

Para todos os efeitos legais, nem a Editora, nem autores, nem editores, nem tradutores, nem revisores ou colaboradores, assumem qualquer responsabilidade por qualquer efeito danoso e/ou malefício a pessoas ou propriedades envolvendo responsabilidade, negligência etc. de produtos, ou advindos de qualquer uso ou emprego de quaisquer métodos, produtos, instruções ou ideias contidos no material aqui publicado.

O Editor

CIP-BRASIL. CATALOGAÇÃO-NA-FONTESINDICATO NACIONAL DOS EDITORES DE LIVROS, RJ
B347b
4.ed.
Baynes, John W.
Bioquímica médica / John W. Baynes, Marek H. Dominiczak. - 4. ed. - Rio de Janeiro : Elsevier, 2015.
il. ; 27 cm.
Tradução de: Medical biochemistry
Inclui apêndice
Inclui bibliografia e índice
ISBN 978-85-352-7903-0
1. Biologia. 2. Bioquímica. 3. Genética. II. Título.
15-19814 CDD: 574
CDU: 574


CÓPIA NÃO AUTORIZADA É CRIME
ABDR
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE DIREITOS REPROGRÁFICOS
RESPEITE O DIREITO AUTORAL

Revisão Científica e Tradução

Revisão Científica

Dr. Mauricio da Silva Baptista
PhD, Marquette University, WI, USA
Post-doctoral fellow, University of Winsconsin-Madison, School of Pharmacy, USA
Professor titular no Departamento de Bioquímica da Universidade de São Paulo
Diretor adjunto de cooperação internacional na AUCUNI-USP

Tradução

Gea Consultoría Editorial
Empresa especializada em traduções médicas

Prefácio

Apresentamos a 4.ª edição do livro *Bioquímica Médica*. Nosso objetivo continua sendo, tal como antes, o fornecimento dos fundamentos bioquímicos para o estudo da medicina clínica — com relevância prática realista.

Um livro didático é um retrato de uma área tal como ela existe no momento da escrita. A metáfora "fotográfica" é adequada à situação, uma vez que a bioquímica sofre constante mutação; no período decorrido desde a publicação da 3.ª edição, ela provavelmente terá mudado de forma mais rápida do que nunca.

Enquanto as vias metabólicas nucleares permanecem quase inalteradas, nosso conhecimento acerca dos mecanismos reguladores subjacentes melhorou graças ao progresso na identificação de vias de sinalização. Em muitas instâncias, essas vias se tornaram alvos para fármacos e sustentam o impressionante progresso terapêutico em áreas como a oncologia.

Desde a conclusão do Projeto Genoma Humano, os estudos de associação genômica ampla e as análises bioinformáticas nos permitiram compor uma nova imagem da regulação genética, cujos marcos são as interações entre múltiplos e heterogêneos fatores de transcrição e promotores gênicos e do campo emergente da epigenética.

Por trás de tudo isso, como já aconteceu muitas vezes na história da ciência, estão grandes avanços metodológicos, incluindo o rastreio genético em rápida expansão. O denominador comum entre as metodologias agora empregadas nos laboratórios de investigação genética e nos laboratórios clínicos hospitalares tem sido o advento da robótica e da bioinformática e, como tal, a capacidade de processar – e interpretar – uma quantidade de dados em constante crescimento.

Esta edição foi, mais uma vez, substancialmente atualizada. Reescrevemos os capítulos sobre lipídios, homeostasia da glicose, nutrição e endocrinologia bioquímica e acrescentamos uma seção acerca dos efeitos do exercício no desenvolvimento muscular e na saúde cardiovascular. O capítulo sobre as "ômicas" incorpora novas direções na proteômica, metabolômica e tecnologia do DNA recombinante.

Esta edição se beneficia igualmente da sabedoria de novos autores, que partilharam suas perspectivas sobre sinalização, metabolismo de gorduras e de glicoconjugados, bioquímica do exercício, nutrição e processos de coagulação sanguínea.

Expandimos o capítulo sobre o trato gastrintestinal como interface importante entre o organismo e o ambiente, e temos agora um pequeno capítulo independente sobre a função renal. Em ambos, providenciamos mais informação acerca dos sistemas de transporte pela membrana. Permanecemos convictos de que a bioquímica do equilíbrio hidroeletrolítico é tão importante para os futuros clínicos quanto as vias metabólicas-

chave – e merece mais ênfase nos currículos de bioquímica.

Atualizamos as referências bibliográficas e on-line ao longo do livro impresso. Simultaneamente, eliminamos alguns links da internet nesta edição, uma vez que as ferramentas de busca e sites, como a Wikipedia e o YouTube, fornecem agora rápido acesso a muitos recursos em célere evolução.

Ao longo do texto nos esforçamos para explicar assuntos complexos da forma mais simples possível, mas tomamos cuidado para não nos tornarmos superficiais. Infelizmente, novas áreas trazem novas terminologias e numerosos aditamentos à nomenclatura científica. A descoberta de novos genes e de novas vias de sinalização significa novos nomes e acrônimos. Identificamo-los aqui não como material a memorizar, mas sim para que auxiliem a construção de uma estrutura de conhecimento sem simplificação excessiva. O fato de alguns capítulos poderem parecer complexos aos iniciantes pode também refletir o verdadeiro estado do conhecimento – a complexidade, ou mesmo um toque de confusão, que frequentemente se apresentam antes de emergir uma imagem coerente.

Assim como anteriormente, agradecemos comentários, críticas e sugestões de nossos leitores. Muitas dessas sugestões se encontram incorporadas a esta 4.ª edição. Não existe melhor forma de continuar a melhorar este livro.

Colaboradores

BSc MBBS MD MRCP FRCPath Catherine N. Bagot, *Consultant Haematologist*
Honorary Clinical Senior Lecturer
Glasgow Royal Infirmary
Glasgow, UK

PhD Gary A. Bannon, *Director*
Section on Protein Analytics
Regulatory Division
Monsanto
St Louis, MO, USA

PhD John W. Baynes, *Carolina Distinguished Professor Emeritus*
Department of Pharmacology, Physiology and Neuroscience
University of South Carolina School of Medicine
Columbia, SC, USA

Graham Beastall, *Formerly Consultant Clinical Scientist*
Department of Clinical Biochemistry
Royal Infirmary
Glasgow, UK

PhD Hanna Bielarczyk, *Assistant Professor*
Head of Department of Laboratory Medicine
Department of Laboratory Medicine
Medical University of Gdańsk
Poland

DSc MBChB FRCPath FRCP(Glas) FRCPE John I. Broom, *Professor and Director*
Centre for Obesity Research and Epidemiology
Robert Gordon University
Aberdeen, Scotland, UK

PhD Wayne E. Carver, *Professor of Cell Biology and Anatomy*
Department of Cell Biology and Anatomy
University of South Carolina School of Medicine
Columbia, SC, USA

MD Dr Hab Med FRCPath FRCP (Glas) Marek H. Dominiczak, ***Hon Professor of Clinical Biochemistry and Medical Humanities***
College of Medical, Veterinary and Life Sciences, University of Glasgow, UK
Docent in Laboratory Medicine
University of Turku, Finland
Consultant Biochemist
Clinical Biochemistry Service
National Health Service (NHS) Greater Glasgow and Clyde, Gartnavel General Hospital
Glasgow, UK

PhD †Alan D. Elbein, *Professor and Chair*

Department of Biochemistry and Molecular Biology
University of Arkansas for Medical Sciences
Little Rock, AR, USA

FRCPath †Alex Farrell, *Consultant Immunologist*
Formerly Head of Department of Immunology and Immunopathology
Histocompatibility and Immunogenetics
Western Infirmary
Glasgow, UK

BSc MD MRCP FRCPath William D. Fraser, *Professor of Medicine*
Norwich Medical School
University of East Anglia
Norwich, UK

PhD Norma Frizzell, *Assistant Professor*
Department of Pharmacology, Physiology and
Neuroscience
University of South Carolina School of Medicine
Columbia, SC, USA

PhD Junichi Fujii, *Professor of Biochemistry and Molecular Biology*
Graduate School of Medical Science
Yamagata University
Yamagata, Japan

BSc PhD Helen S. Goodridge, *Research Scientist*
Immunobiology Research Institute
Cedars-Sinai Medical Center
Los Angeles, CA, USA

PhD BSc (Hons) J. Alastair Gracie, *Senior University Teacher*
School of Medicine
College of Medical, Veterinary and Life Sciences
University of Glasgow
Glasgow, UK

MD PhD Alejandro Gugliucci, *Director of Research and Sponsored Programs*
Associate Dean of Research
Professor of Biochemistry
Touro University California
College of Osteopathic Medicine
Vallejo, CA, USA

BSc(Hons) PhD Margaret M. Harnett, *Professor of Immune Signalling*
Division of Immunology, Infection and Inflammation
Glasgow Biomedical Research Centre
University of Glasgow
Glasgow, UK

PhD FRCPath Simon J.R. Heales, *Professor of Clinical Chemistry*
Department of Chemical Pathology
Great Ormond Street Hospital
London, UK

PhD George M. Helmkamp Jr., *Emeritus Professor of Biochemistry*
Department of Biochemistry and Molecular Biology
University of Kansas School of Medicine

Kansas City, KS, USA

MD PhD Koichi Honke, *Professor of Biochemistry*
Department of Biochemistry
Kochi University Medical School
Kochi, Japan

BA PhD D. Margaret Hunt, *Emeritus Professor*
Department of Pathology, Microbiology and immunology
University of South Carolina School of Medicine
Columbia, SC, USA

MBChB(Hons) PhD FRCP(Glas) Andrew Jamieson, *Consultant Physician*
Department of Medicine
Hairmyres Hospital
East Kilbride, UK

MA MB BChir DPhil FRCP FRCPath Alan F. Jones, *Consultant Physician and Associate Medical Director*
Birmingham Heartlands Hospital
Birmingham, UK

PhD FRCP Fredrik Karpe, *Professor of Metabolic Medicine*
University of Oxford
Oxford, UK

PhD Gur P. Kaushal, *Professor of Medicine*
University of Arkansas for Medical Sciences
Research Career Scientist
Central Arkansas Veterans Healthcare System
Little Rock, AR, USA

PhD W. Stephen Kistler, *Professor of Biochemistry*
Department of Chemistry and Biochemistry
University of South Carolina
Columbia, SC, USA

MD FRSE Walter Kolch, *Director*
Systems Biology Ireland
Conway Institute
University College
Dublin, Ireland

PhD FACSM HFS Matthew C. Kostek, *Assistant Professor of Physical Therapy*
Department of Physical Therapy
Duquesne University
Pittsburgh, PA, USA

MBBS MD MRCP DipRCPath Utkarsh V. Kulkarni, *Senior Research Fellow*
Centre for Obesity Research and Epidemiology
The Robert Gordon University
Aberdeen, UK

MBChB MRCP MD FRCPath Jennifer Logue, *Clinical Senior Lecturer in Metabolic Medicine*
University of Glasgow
British Heart Foundation Cardiovascular Research Centre
Glasgow, UK

DSc MD FRCP Gordon D.O. Lowe, *Emeritus Professor*

Institute of Cardiovascular & Medical Sciences
University of Glasgow
Glasgow, UK

PhD Masatomo Maeda, *Professor of Molecular Biology*
Department of Molecular Biology
School of Pharmacy, Iwate Medical University
Iwate, Japan

BSc(Hons) PhD Alison M. Michie, *Senior Lecturer in Molecular Lymphopoiesis*
University of Glasgow
Glasgow, UK

PhD Ryoji Nagai, *Associate Professor*
Laboratory of Food and Regulation Biology
School of Agriculture
Tokai University Kawayou, Minamiaso
Kumamoto, Japan

PhD Jeffrey R. Patton, *Associate Professor*
Department of Pathology, Microbiology, and Immunology
University of South Carolina School of Medicine
Columbia, SC, USA

Verica Paunović, *Postdoctoral Researcher*
Institute of Microbiology and Immunology
School of Medicine, University of Belgrade,
Belgrade, Serbia

BSc DPhil Andrew R. Pitt, *Professor of Pharmaceutical Chemistry and Chemical Biology*
Aston University
Birmingham, UK

MbChB FRCP(Glas) Matthew Priest, *Consultant Gastroenterologist*
Gartnavel General Hospital
Glasgow, UK

PhD Allen B. Rawitch, *Professor of Biochemistry and Molecular Biology*
Vice Chancellor for Academic Affairs
Dean of Graduate Studies
University of Kansas Medical Center
Kansas City, KS, USA

BSc PhD Ian P. Salt, *Senior Lecturer in Molecular Cell Biology*
Institute of Cardiovascular & Medical Sciences
Davidson Building
University of Glasgow
Glasgow, UK

FRCP PhD Robert K. Semple, *Wellcome Trust Senior Clinical Fellow and Honorary Consultant Physician*
University of Cambridge Metabolic Research Laboratories
Addenbrooke's Hospital
Cambridge, UK

PhD L. William Stillway, *Emeritus Professor of Biochemistry and Molecular Biology*

Department of Biochemistry and Molecular Biology
Medical University of Southern Carolina
Charleston, SC, USA

PhD Mirosława Szczepańska-Konkel, *Professor of Clinical Biochemistry*
Department of Clinical Chemistry
Medical University of Gdańsk
Gdańsk, Poland

MD PhD Andrzej Szutowicz, *Professor*
Department of Laboratory Medicine
Medical University of Gdańsk
Poland

MD PhD Naoyuki Taniguchi, *Group Director, Systems Glycobiology Group*
RIKEN Advanced Science Institute
Wako, Saitama, Japan

FRCPATH MRCP MBBS Yee Ping Teoh, *Consultant in Chemical Pathology and Metabolic Medicine*
Wrexham Maelor Hospital
Wales, UK

PhD MD DSc FRCPath FRCP Edward J. Thompson, *Emeritus Professor of Neurochemistry*
Department of Neuroimmunology
Institute of Neurology
National Hospital for Nervous Diseases
London, UK

PhD Robert Thornburg, *Professor of Biochemistry*
Department of Biochemistry, Biophysics and Molecular Biology
Iowa State University
Ames, IA, USA

BSc MSc PhD FRCPath †A. Michael Wallace, *Professor, University of Strathclyde*
Consultant Clinical Scientist
Department of Clinical Biochemistry
Royal Infirmary
Glasgow, UK

Dedicatória

Aos acadêmicos inspiradores

Estudantes curiosos

E a todos que desejam ser bons médicos

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaríamos de agradecer a nossos colaboradores por compartilharem sua sabedoria conosco e por encaixarem a escrita – novamente – em seus atarefados horários de pesquisa, ensino e clínica. Nesta 4.ª edição, damos as boas-vindas a vários novos colaboradores: Catherine Bagot, Norma Frizzel, Koichi Honke, Fredrik Karpe, Matthew Kostek, Jennifer Logue, Alison Michie, Matthew Priest, Ryoji Nagai e Ian Salt. Estamos muito felizes por tê-los conosco.

Entristeceu-nos o falecimento de A. Michael Wallace e de Alan D. Elbein, nossos bons amigos e colaboradores em edições anteriores.

À semelhança das outras edições, apreciamos muito a excelente assistência de secretariado por parte de Jacky Gardiner, em Glasgow.

Estamos muito agradecidos aos estudantes e acadêmicos de universidades de todo o mundo que continuam a fornecer-nos comentários, críticas e sugestões.

A chave para todo o projeto foi, claro, a equipe da Elsevier. Os nossos agradecimentos se dirigem a Nani Clansey, Editora de Desenvolvimento Sênior, que conduziu entusiasticamente o projeto, assim como a Meghan K. Ziegler e a Madelene Hyde, que formularam a estratégia. Estamos muito gratos à equipe de produção, Anne Collett, Samuel Crowe e Andrew Riley, que deram a este livro sua forma final.

Nossa inspiração para alterar e melhorar este texto vem também do "campo" – dos problemas, questões e decisões que surgem em nossa prática clínica diária, na clínica de ambulatório e nas visitas médicas. Assim, dirigimos um agradecimento final a todos os colegas da clínica e médicos em formação.

Abreviaturas

1,25(OH)$_2$D$_3$ 1,25-di-hidroxivitamina D$_3$

2,3-BPG 2,3-bifosfoglicerato

3-PG 3-fosfoglicerato

5-HIAA ácido 5-hidroxi-indolacético

5-HT 5-hidroxitriptamina

8-oxo-G 8-oxo-2′-desoxiguanosina

A adenina

ABC região no transportador que liga ATP (*ATP binding cassette*)

ACE enzima conversora de angiotensina [ECA]

Acetil-CoA acetil coenzima A

ACh acetilcolina

ACP proteína carreadora de acil

ACTase aspartato carbamoiltransferase

ACTH hormônio adrenocorticotrófico

ADC complexo da demência ligada à AIDS

ADH álcool desidrogenase

ADH hormônio antidiurético (também conhecido como AVP)

ADP difosfato de adenosina

AE trocador de ânions

AFP alfafetoproteína [αFP]

AGE ácidos graxos essenciais

AGE produto final de glicosilação avançada

AHF fator anti-hemofílico

AICAR 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleotídeo

AIDS síndrome da imunodeficiência adquirida [SIDA]

AIR 5-aminoimidazol ribonucleotídeo

ALDH aldeído desidrogenase
ALP fosfatase alcalina [FA]
ALT alanina aminotransferase
AML leucemia mieloblástica aguda [LMA]
AMP monofosfato de adenosina
ANP peptídeo natriurético atrial
APC polipose adenomatosa coli (gene)
apoA, B etc. apoproteína A, B etc.
APRT adenosina fosforribosil transferase
APTT tempo de tromboplastina parcialmente ativada [TPTA]
AQP aquaporina
ARDS síndrome da insuficiência respiratória aguda [SARA]
ARE elemento de resposta antioxidante
AST aspartato aminotransferase [TGO]
ATF fator de ativação da transcrição
ATM gene mutado da ataxia telangiectasia
ATP trifosfato de adenosina
AVP argininovasopressina (igual a hormônio antidiurético)
AZT azido-2′,3′-didesoxitimidina
***Bcl*-2** proteína 2 de linfoma de célula B
BNP peptídeo natriurético cerebral
bp par de bases
BUN nitrogênio ureico, equivalente à ureia (não é sinônimo)
bw peso corporal
C citosina
CA anidrase carbônica [AC]
CAD endonuclease dependente de caspase
CAIR carboxiaminoimidazol ribonucleotídio
cAMP AMP cíclico (AMPc)
CAT catalase
CD designação de *cluster:* sistema de classificação para moléculas de superfície celular
CDGS síndromes da glicoproteína deficiente em carboidrato

CDK cinase dependente de ciclina

CDKI inibidor da cinase dependente de ciclina

CDP difosfato de citidina

CFTR regulador da condutância transmembrana da fibrose cística

cGMP GMP cíclico (GMPc)

CGRP peptídeo relacionado com o gene da calcitonina

CML leucemia mieloide crônica [LMC]

CMP monofosfato de citidina

CNS sistema nervoso central [SNC]

COAD ou COPD doença pulmonar obstrutiva crônica [DPOC]

COMT catecol-*O*-metiltransferase

CoQ_{10} coenzima Q_{10} (ubiquinona)

COX-1 ciclo-oxigenase-1

CPK ou CK creatina fosfocinase

CPS I, II carbamoil fosfato sintetase I, II

CPT I, II carnitina palmitiltransferase I, II

CREB proteína de ligação do elemento de resposta ao AMP cíclico

CRGP gene do peptídeo relacionado à calcitonina

CRH hormônio de liberação de corticotropina

CRP proteína C-reativa

CSF líquido cerebroespinal [LCR]

CT calcitonina

CTP trifosfato de citidina

CVS biopsia de vilosidade coriônica

DAG diacilglicerol

DCC gene de "deleção no carcinoma de cólon"

DCG defeitos congênitos da glicosilação

ddATP trifosfato de didesoxiadenosina

DDC 2′-3′-didesoxicitidina

ddNTPs didesoxinucleotídios

DEAE dietilaminoetil

DGGE eletroforese em gel com gradiente de desnaturante

DHAP fosfato de di-hidroacetona

DIC coagulação intravascular disseminada [CID ou CIVD]

DIPF, DFP di-isopropilfosfofluoreto

DNA ácido desoxirribonucleico

DNP 2,4-dinitrofenol

dNTPs desoxinucleotídios

Dol-P dolicol fosfato

Dol-PP-GlcNAc dolicol pirofosfato-*N*-acetilglicosamina

DOPA di-hidroxifenilalanina

DPPC dipalmitilfosfatidilcolina

DVT trombose venosa profunda

EBV vírus Epstein-Barr

ECF líquido extracelular [LEC]

ECM matriz extracelular [MEC]

EDRF fator de relaxamento derivado do endotélio (óxido nítrico)

EDTA ácido etilenodiaminotetracético

EF-1,2 fator de alongamento 1, 2

EGF fator de crescimento epidérmico

eIF-3 fator de iniciação da tradução eucariótica 3

EMSA ensaio de mudança de mobilidade eletroforética

ENaC canal de sódio epitelial

ER retículo endoplasmático [RE]

ERK cinase regulada extracelularmente

ESR taxa de sedimentação de eritrócitos (glóbulos vermelhos)

FACIT colágeno associado à fibrila com triplas hélices interrompidas

FAD flavina adenina dinucleotídio

FADD proteína acessória do "domínio da morte"

$FADH_2$ flavina adenina dinucleotídio reduzido

FAICAR 5-formoilaminoimidazol-4- carboxamida ribonucleotídio

FAP polipose adenomatosa familiar [PAF]

Fas molécula de sinalização da apoptose: proteína acessória do "domínio da morte" (CD95)

FBPase frutose bifosfatase

FDP produto de degradação da fibrina

FGAR formoilglicinamida ribonucleotídio

FGF fator de crescimento dos fibroblastos

FHH hipercalcemia hipocalciúrica familiar

FMN flavina mononucleotídio

$FMNH_2$ flavina mononucleotídio reduzido

FRAXA síndrome do X frágil

Fru-1,6-BP frutose-1,6-bifosfato

Fru-2,6-BP frutose-2,6-bifosfato

Fru-2,6-BPase frutose-2,6 bifosfatase

Fru-6-P frutose-6-fosfato

FSF fator estabilizador da fibrina

FSH hormônio foliculoestimulante

G guanina

G3PDH (GAPDH) gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GABA ácido γ-aminobutírico

GAG glicosaminoglicana

Gal galactose

Gal-1-P galactose-1-fosfato

GalNAc *N*-acetilgalactosamina

$GalNH_2$ galactosamina

GAP proteína ativadora da guanosina trifosfatase

GAPDH gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GAR glicinamida ribonucleotídio

GDH glutamato desidrogenase

GDP difosfato de guanosina

GDP-Fuc difosfato de guanosina-l-fucose

GDP-Man difosfato de guanosina-manose

GFAP proteína ácida fibrilar glial

GGT ou γGT gamaglutamiltransferase/transpeptidase

GH hormônio do crescimento

GHRH hormônio liberador do hormônio do crescimento

GIP peptídio insulinotrópico glicose-dependente

GIT trato gastrintestinal [TGI]

GK glicocinase

Glc glicose

Glc-1-P glicose-1-fosfato

Glc-6-P glicose-6-fosfato

Glc-6-Pase glicose-6-fosfatase

GlcN-6-P glicosamina-6-fosfato

GlcNac *N*-acetilglicosamina

GlcNAc-1-P *N*-acetilglicosamina-1-fosfato

GlcNAc-6-P *N*-acetilglicosamina-6-fosfato

$GlcNH_2$ glicosamina

GlcUA ácido-D-glicurônico

GLP-1 peptídio 1 semelhante ao glucagon

GLUT transportador da glicose (GLUT-1-GLUT-5)

GM_1 monossialogangliosídio 1

GMP monofosfato de guanosina

GnRH hormônio liberador de gonadotrofina

GPIb-IXa etc. receptor glicoproteico 1b-IXa etc.

GPx glutationa peroxidase

GRE elemento responsivo a glicocorticoides

GSH glutationa reduzida

GSSG glutationa oxidada

GTP trifosfato de guanosina

GTPase guanosina trifosfatase

Hb, HB ou HGB hemoglobina

HBOC carreador de oxigênio à base de Hb

HCM hipercalcemia associada à malignidade

Hct hematócrito [Ht]

HGF-R receptor do fator de crescimento de hepatócito

HGP Projeto Genoma Humano

HGPRT hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase

HIV vírus da imunodeficiência humana

HLA antígeno leucocitário humano (sistema de)

HLH hélice-alça-hélice (motivo)

HMG hidroximetilglutaril

HMWK cininogênio de alto peso molecular

HNPCC câncer de colo e reto hereditário sem polipose

hnRNA ácido ribonucleico heteronuclear

HPLC cromatografia líquida de alta eficiência

HPT hiperparatireoidismo

HRT terapia de reposição hormonal [TRH]

HTGL triglicerídio lipase hepática

HTH hélice-volta-hélice (motivo)

ICAM-1 molécula 1 de adesão intracelular

ICF líquido intracelular [LIC]

IDDM diabetes melito dependente da insulina (abreviatura substituída por diabetes melito tipo 1)

IDL lipoproteína de densidade intermediária

IdUA ácido L-idurônico

IEF focalização isoelétrica

IFN(-γ) interferon-γ

Ig imunoglobulina

IGF fator de crescimento de insulina

IGF-1 fator de crescimento 1 semelhante à insulina

IL interleucina (IL-1 – IL-29)

IMB índice de metabolismo basal

IMC índice de massa corporal

IMP monofosfato de inositina

Inr iniciador (sequência de um gene)

IP_1, I-1-P_1, I-4-P_1 etc. monofosfato de inositol

IP_2, I-1, 3-P_2, I-1, 4-P_2 difosfato de inositol

IP_3, I-1, 4, 5-P_3 trifosfato de inositol

IRE elemento responsivo ao ferro

IRE-BP proteína de ligação do IRE

IRMA ensaio imunorradiométrico

ITAM domínio de ativação do imunorreceptor tipo tirosina cinase

ITIM domínio de inibição do imunorreceptor tipo tirosina cinase

JAK Janus cinase

JNK cinase do *N*-terminal de Jun

K constante de equilíbrio

Kb quilobase

kbp par(es) de quilobase(s)

KCCT tempo de coagulação do caulim-cefalina

KIP2 molécula reguladora do ciclo celular

K_m constante de Michaelis

LACI inibidor da coagulação associado à lipoproteína

LCAT lecitina-colesterol aciltransferase

LDH lactato desidrogenase

LDL lipoproteína de baixa densidade

LH hormônio luteinizante

LPL lipoproteína lipase

LPS lipopolissacarídio

LRP-LDL proteína relacionada ao receptor de LDL

Malonil-CoA malonil-coenzima A

Man manose

Man-1-P manose-1-fosfato

Man-6-P manose-6-fosfato

MAO monoamina oxidase

MAPK proteína cinase ativada por mitógeno (uma superfamília de cinases transdutoras de sinal)

Mb mioglobina
MCHC concentração de hemoglobina corpuscular média [CHCM]
MCP-1 proteína 1 quimioatraente de monócito
M-CSF-R receptor do fator estimulante de colônia de macrófagos
MCV volume corpuscular médio [VCM]
MDR resistência a multifármacos
MEKK cinase de proteína cinase ativada por mitógeno
MEN-IIA neoplasia endócrina múltipla tipo II
met-tRNA metionil-tRNA
MGUS gamapatia monoclonal de significado indeterminado
MHC complexo maior de histocompatibilidade
miRNAs microRNAs
MMPs metaloproteinases de matriz
MPO mieloperoxidase
mRNA ácido ribonucleico mensageiro
MRP proteína associada à resistência a multifármacos
MS espectrometria de massa [EM]
MSH hormônio estimulador dos melanócitos
MSUD doença da urina de xarope de bordo
MyoD fator de transcrição célula muscular-específico
Na^+/K^+-ATPase transportador de sódio e potássio contragradiente, com gasto de ATP
NABQI *N*-acetilbenzoquinoneimina
NAC *N*-acetilcisteína
NAD^+ nicotinamida adenina dinucleotídio (oxidado)
NADH nicotinamida adenina dinucleotídio (reduzido)
$NADP^+$ nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato (oxidado)
NADPH nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato (reduzido)
NANA ácido *N*-acetilneuramínico (ácido siálico)
ncRNA RNA não codificador muito pequeno
NF fator nuclear
NF-II neurofibromatose tipo II
NGF fator de crescimento de nervo

NHE trocador de sódio-hidrogênio

NIDDM diabetes melito não insulinodependente (termo agora substituído por diabetes melito tipo 2)

NKCC1 cotransportador 1 de Na-K-Cl (etc.)

NMDA *N*-metil-D-aspartato

NPY neuropeptídeo Y

NSAID anti-inflamatório não esteroidal [AINES]

nt nucleotídeo (como medida de tamanho/comprimento de um ácido nucleico)

OGTT teste de tolerância oral à glicose [TTOG]

OxS estresse oxidante

***p38*RK** cinase de reativação *p38*

PA ácido fosfatídico

Pa pascal

PAF fator de ativação de plaquetas

PAGE eletroforese em gel de poliacrilamida

PAI-1 inibidor do ativador de plasminogênio 1

PAPS fosfoadenosina fosfossulfato

PC fosfatidilcolina

PC piruvato carboxilase

PCR reação em cadeia da polimerase

PDE fosfodiesterase

PDGF fator de crescimento derivado de plaquetas

PDH piruvato desidrogenase

PDK cinase dependente de fosfatidilinositol

PE fosfatidil etanolamina

PEP ácido fosfoenolpirúvico

PEPCK fosfoenolpiruvato carboxicinase

PF3 fator plaquetário 3

PFK-1 (-2) fosfofrutocinase-1 (2)

PGG_2 etc. prostaglandina G_2 etc.

PGK fosfogliceratocinase

PGM fosfoglicomutase

PHHI hipoglicemia hiperinsulinêmica persistente da infância

PHP pseudo-hipoparatireoidismo

Pi fosfato inorgânico

PI3K fosfatidilinositol 3′-cinase

PIP_2/PIP_3 bifosfato/trifosfato de fosfatidilinositol

PK piruvato cinase

PKA/PKC proteína cinase A/C

PKR proteína cinase ativada por dsRNA

PKU fenilcetonúria

PL fosfolipase A etc.

PLA/PLC fosfolipase A/C

PMA ácido forbol mirístico

PNS sistema nervoso periférico [SNP]

PPAR receptor ativado por agentes que estimulam a proliferação de peroxissomos

PPi pirofosfato inorgânico

PRL prolactina (PL)

PrP proteína príon

PRPP 5-fosforribosil-α-pirofosfato

PS fosfatidilserina

PT tempo de protrombina

PTA antecedente da tromboplastina plasmática

PTH paratormônio

PTHrP proteína relacionada ao paratormônio

PTK proteína tirosina cinase

PTPase fosfotirosina fosfatase

Py base pirimidina (numa sequência de nucleotídio)

R receptor (com qualificador, não isolado)

RAIDD proteína acessória do "domínio da morte"

Rb proteína do retinoblastoma

RBC hemácia [CVS]

RDS síndrome da disfunção respiratória

RER retículo endoplasmático rugoso
RFLP polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição
RIP proteína acessória do "domínio da morte"
RKK homólogo p38RK de MEK
RNA ácido ribonucleico
RNAi RNA de interferência
RNAPol I/II RNA polimerase I/II
RNR ribonucleotídio redutase
RNS espécies reativas do nitrogênio [ERN]
ROS espécies reativas do oxigênio [ERO]
S svedberg (unidade)
SACAIR 5-aminoimidazol-4-(*N*- succinilocarboxamida) ribonucleotídio
SAM *S*-adenosilmetionina
SAPK proteína cinase ativada por estresse
SCIDS síndrome de imunodeficiência combinada grave
scuPA ativador do plasminogênio do tipo urinário de cadeia única
SD desvio-padrão
SDS sódio dodecil sulfato
SDS-PAGE eletroforese em gel de poliacrilamida com sódio dodecil sulfato
SEK homológo SAPK de MEK
SER retículo endoplasmático liso
ser-P serina-fosfato
SGLT transportador de glicose acoplado ao Na^+ (simporte)
SH hormônio esteroide (figuras somente)
SH2 região-2 de homologia a Src
SIADH síndrome da secreção inadequada do hormônio antidiurético
siRNA pequeno RNA de interferência
snRNA RNA nuclear pequeno
SOD superóxido dismutase
SPCA acelerador sérico de conversão de protrombina
Src tipo de proteína tirosina cinase
SRE elemento de resposta a esteroide

SREBPs proteínas de ligação ao elemento regulador de esteróis (SREBP 1a, SREBP 1c)

SRP partícula de reconhecimento de sinal

SSCP polimorfismo conformacional de fita simples

SSRI inibidor seletivo da recaptação de serotonina

STAT transdutor de sinal e ativador da transcrição

SUR receptor da sulfonilureia

T timina

T_3 tri-iodotironina

T_4 tiroxina

TAG triacilglicerol (triglicerídio)

TAP transportador de peptídeo no RE associado à apresentação de antígeno

TB tuberculose

TBG globulina transportadora de hormônio da tireoide

TCA ácido tricarboxílico

TCT tempo de coagulação da trombina

TEG tromboelastografia

TF fator de transcrição (com qualificador) [FT]

TFPI inibidor da via do fator tecidual

TG triacilglicerol (triglicerídio)

TGF(-β) fator β da transformação do crescimento

T_{max} Km para proteína de transporte facilitado

TMB taxa metabólica basal

TNF fator de necrose tumoral

TNF-R receptor do fator de necrose tumoral

tPA ativador do plasminogênio do tipo tecidual

TRADD proteína acessória com "domínio da morte"

TRAFS proteína acessória com "domínio da morte"

TRH hormônio liberador da tireotropina

TSH hormônio tireoestimulante (tireotropina)

TTP trifosfato de timidina

TXA_2 tromboxano A_2

U uridina

UCP proteína desacopladora [PD]

UDP difosfato de uridina

UDP-Gal UDP-galactose

UDP-GalNAc UDP-*N*-acetilgalactosamina

UDP-Glc UDP-glicose

UDP-GlcNAc UDP-*N*-acetilglicosamina

UDP-GlcUA UDP ácido glicurônico

UMP monofosfato de uridina

uPA ativador do plasminogênio do tipo urinário

UTR região não traduzida

UV ultravioleta

VCAM-1 molécula 1 de adesão de células vasculares

VDCC canais de cálcio voltagem-dependente (ou dependentes de voltagem) [CCVD]

VIP peptídio intestinal vasoativo

VLDL lipoproteína de muito baixa densidade

vWF fator de von Willenbrand

WAF1 regulador do ciclo celular

XMP monofosfato de xantina

XO xantina oxidase

XP xeroderma pigmentosum

X-SCID imunodeficiência combinada grave ligada ao X

ZP3 glicoproteína 3 da zona pelúcida

CAPÍTULO 1

Introdução

John W. Baynes and Marek H. Dominiczak

Bioquímica e medicina clínica

Este livro chama-se *Bioquímica Médica* porque focaliza aspectos da bioquímica relevantes para a medicina. Ou seja, explica o funcionamento do organismo como um sistema químico e sua disfunção na doença. A bioquímica fornece a base para entender a ação de novos fármacos, como antidepressivos, medicamentos usados no tratamento de diabetes, hipertensão e insuficiência cardíaca, e aqueles que reduzem lipídios no sangue. Além disso, descreve as aplicações clínicas de proteínas recombinantes, vetores virais e "ômicos": proteômicos, genômicos e metabolômicos. Ao fornecer informações sobre nutrição, exercício e estresse metabólico, contribui para a compreensão de como a dieta e o estilo de vida influenciam nossa saúde e nosso desempenho e como o organismo envelhece. Também descreve como a sinalização celular e os sistemas de comunicação respondem aos estresses endógeno e ambiental. A bioquímica médica incorpora também o enorme progresso advindo recentemente na compreensão da genética humana e relaciona-o com os campos emergentes da nutrigenômica e da farmacogenômica, que poderão criar a base para terapêuticas personalizadas com base no perfil genético de um indivíduo.

A bioquímica é estudada para compreender a interação entre nutrição, metabolismo e genética na saúde e na doença

Por um lado, o organismo humano é um sistema metabólico integrado, independente e rigorosamente controlado. Por outro, é um sistema aberto e que comunica com o ambiente ao redor. Apesar dessas duas características aparentemente contraditórias, o organismo consegue manter seu ambiente interno durante décadas. Regularmente abastecemos nossas reservas de combustível (consumo de alimento) e água e captamos oxigênio do ar inspirado para ser usado no metabolismo oxidativo (que é, na verdade, uma cadeia de reações de combustão a temperaturas baixas). Usamos depois a energia gerada pelo metabolismo para realizar atividades e manter a temperatura corporal. Eliminamos (exalamos ou excretamos), ainda, dióxido de carbono, água e resíduos nitrogenados. A quantidade e a qualidade dos alimentos que consumimos têm impacto significativo em nossa saúde — desnutrição, obesidade e diabetes são atualmente os principais problemas de saúde pública no mundo.

Bioquímica em duas páginas

Diz-se que qualquer texto pode ser encurtado. Por isso, lançamo-nos ao desafio de tentar condensar o livro em menos de "duas páginas". Isso significa oferecer ao leitor uma visão geral, mas também criar um mecanismo útil para um estudo posterior. Os termos em destaque apresentam os conteúdos dos capítulos deste livro.

Os principais componentes estruturais do corpo são as proteínas, os carboidratos e os lipídios

As **proteínas** são os "blocos de construção" e os "catalisadores". Como unidades estruturais, formam a estrutura "arquitetônica" dos nossos tecidos. Já como enzimas, em conjunto com moléculas auxiliares (**coenzimas** e **cofatores**), catalisam reações bioquímicas. Por sua vez, os **lipídios**, como o colesterol e os fosfolipídios, consistem nas principais membranas biológicas.

Os **carboidratos** e os **lipídios**, enquanto monômeros ou polímeros relativamente simples, são nossas principais fontes de energia. Suas formas de armazenamento nos tecidos são o glicogênio e os triglicerídios. No entanto, os carboidratos podem ser ligados a proteínas e lipídios e formar estruturas complexas (glicoconjugados) essenciais à sinalização celular e a processos como a adesão celular e a imunidade.

Variáveis químicas, como o **pH**, a **pressão de oxigênio**, as **concentrações de íons inorgânicos** e os **tampões**, definem o ambiente homeostático em que ocorre o metabolismo. Pequenas alterações nesse ambiente, por exemplo, menos de um quinto de uma unidade de pH ou apenas alguns graus na temperatura corporal, podem levar a risco de vida.

O **sangue** é um meio de transporte fundamental que participa na troca de gases, combustíveis, metabólitos e "informação" entre os tecidos. Além disso, o plasma, que pode facilmente ser coletado e analisado, é uma "janela" acessível para o metabolismo e serve como fonte de informação clínica.

As **membranas biológicas** separam as vias metabólicas em diferentes compartimentos celulares. Sua estrutura impermeável é dotada de um conjunto de "portas e portões" (transportadores membranares) e "fechaduras" que aceitam variadas chaves (hormônios, citocinas e outros receptores) e produzem sinais intracelulares. Eles são fundamentais no **transporte de íons** e **metabólitos** e também na **transdução de sinais**, tanto entre células, quanto dentro de uma mesma célula. A maior parte da energia no corpo é utilizada para manter os gradientes de concentração de íons e metabólitos por meio das membranas biológicas, o que salienta a importância desses processos. Além disso, as células do organismo todo são absolutamente dependentes dos potenciais de membrana. Estes são utilizados para transmissão nervosa, contração muscular, transporte de nutrientes e manutenção do volume celular.

A energia liberada pelos nutrientes é distribuída na forma de adenosina trifosfato

A obtenção de energia em sistemas biológicos ocorre por meio da **fosforilação oxidativa** que ocorre na mitocôndria. Este processo envolve consumo de oxigênio, ou **respiração**, na

qual utilizamos a energia dos combustíveis para produzir um gradiente de íons de hidrogênio ao longo da membrana mitocondrial e capturamos essa energia na forma de **adenosina trifosfato (ATP)**. Os bioquímicos referem-se ao ATP como a "moeda corrente do metabolismo", uma vez que possibilita que a energia do metabolismo dos combustíveis seja usada no trabalho, no transporte e na biossíntese.

O metabolismo é uma rede sofisticada de processos químicos

Os **carboidratos** e **lipídios** são nossas fontes primárias de energia, mas as necessidades nutricionais também envolvem aminoácidos (componentes das **proteínas**), moléculas inorgânicas contendo fosfato, sódio, potássio e outros átomos em sua constituição e micronutrientes, como **vitaminas** e **oligoelementos**. A glicose é metabolizada pela **glicólise**, uma via universal para produção de energia que não requer oxigênio (anaeróbica). A glicólise transforma a glicose em piruvato, deixando a fase do metabolismo oxidativo para a mitocôndria. Também produz metabólitos que são precursores para a síntese de **aminoácidos**, **proteínas**, **lipídios** e **ácidos nucleicos**.

A glicose é o combustível mais importante para o cérebro: por isso, a manutenção de sua concentração no plasma é essencial para nossa sobrevivência. O suprimento de glicose está ligado ao metabolismo do **glicogênio**, o modo de armazenamento de curto prazo da glicose. A homeostasia da glicose é regulada por hormônios que coordenam as atividades metabólicas nas células e órgãos — principalmente insulina e glucagon, e também epinefrina (adrenalina) e cortisol.

O oxigênio é essencial para a produção de energia, mas também pode ser tóxico

Durante o metabolismo aeróbico, o piruvato é transformado em **acetil-coenzima A (acetil-CoA)**, que é o intermediário comum no metabolismo de carboidratos, lipídios e aminoácidos. A acetil-CoA entra no mecanismo metabólico central da célula, o **ciclo do ácido tricarboxílico (ciclo TCA)** nas mitocôndrias. A acetil-CoA é oxidada a **dióxido de carbono** e reduz coenzimas importantes, como **nicotinamida adenina dinucleotídio (NAD^+)** e **flavina adenina dinucleotídio (FAD)**. A redução desses nucleotídios capta a energia libertada pela oxidação do combustível. Estes, por sua vez, tornam-se os substratos para a via final, a **fosforilação oxidativa**, em que os elétrons por eles carregados reduzem o oxigênio molecular por meio de uma cadeia de reações de **transporte de elétrons**, fornecendo a energia para a **síntese de ATP**. Enquanto o oxigênio é essencial para o metabolismo aeróbico, este também pode causar estresse oxidativo e causar danos nos tecidos durante a inflamação. Para proteger células e tecidos dos efeitos nocivos do oxigênio, o organismo é dotado de poderosas **defesas antioxidantes**.

O metabolismo alterna continuamente entre estados de jejum e alimentação

A direção das principais vias do metabolismo de carboidratos e lipídios muda em resposta à ingestão de alimento. No estado alimentado, as vias ativas são a **glicólise**, a **síntese de glicogênio**, a **lipogênese** e a **síntese de proteínas**, que renovam os tecidos e armazenam o excesso de combustível metabólico. No estado de jejum, a direção do metabolismo é invertida: o glicogênio e os lipídios armazenados são degradados por

meio da **glicogenólise** e da **lipólise**, fornecendo um aporte constante de **substratos para a produção de energia**. Com a diminuição das reservas de glicogênio, as proteínas são sacrificadas para produzir glicose por meio da **gliconeogênese**, garantindo seu fornecimento constante, enquanto outras vias biossintéticas abrandam-se. Doenças comuns como diabetes melito, obesidade e aterosclerose, que são atualmente os principais problemas de saúde pública, resultam de desajustes no metabolismo e no transporte de combustível.

Os tecidos executam funções especializadas

Essas funções envolvem contração muscular, condução nervosa, formação óssea, vigilância imune, sinalização hormonal, manutenção do pH e balanço hidroeletrolítico e desintoxicação de substâncias exógenas. Compostos especializados, como os **glicoconjugados** (glicoproteínas, glicolipídios e proteoglicanos), são necessários para a organização tecidual e as comunicações célula-célula. Progressos recentes na compreensão dos sistemas de sinalização celular melhoraram nosso conhecimento sobre **crescimento celular** e **mecanismos de reparação**. O declínio das células ao longo do tempo leva ao **envelhecimento**, e sua falha causa doenças como o **câncer**.

O genoma é o alicerce para tudo

O genoma fornece o mecanismo de conservação e transferência da informação genética por meio da regulação da expressão gênica e do controle da síntese de proteínas. A síntese de proteínas é controlada pela informação codificada no **ácido desoxirribonucleico (DNA)** e transcrita para o **ácido ribonucleico (RNA)**, que é então traduzido em peptídios que, adquirindo sua conformação, formam **moléculas proteicas funcionais**. O perfil de proteínas expresso e o controle de sua expressão temporal durante o desenvolvimento, a adaptação e o envelhecimento são responsáveis pela nossa composição proteica. Nos últimos anos, a bioinformática, os estudos de associação de todo o genoma e os progressos na compreensão da epigenética forneceram informações totalmente fascinantes acerca da complexidade das redes reguladoras genéticas. Além disso, aplicações das tecnologias de **DNA recombinante** têm revolucionado o trabalho de laboratórios clínicos durante a última década. A capacidade recente de analisar todo o genoma e o potencial da **proteômica** e da **metabolômica** geram ainda novos dados para a compreensão da síntese de proteínas controlada por genes.

Este capítulo está resumido na Figura 1.1. A figura assemelha-se ao mapa do metrô de Londres (Leituras Sugeridas). Ao analisá-la, não se intimide com os muitos termos ainda não conhecidos. Volte à figura conforme o progresso de seu estudo. Você notará como sua compreensão sobre a bioquímica aumenta.

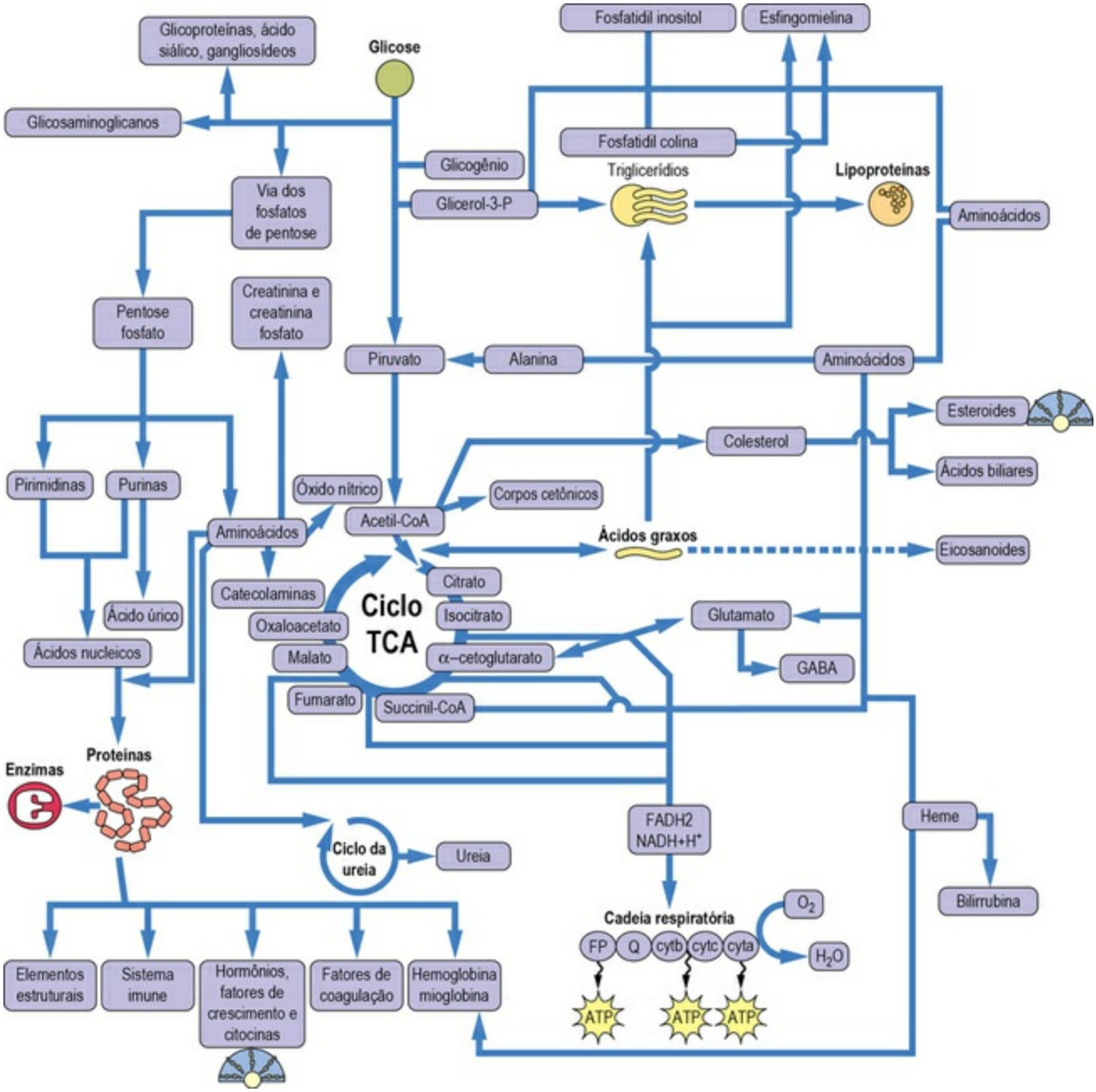


FIG. 1.1 Bioquímica: visão geral.
Esta figura dará a você uma visão abrangente da bioquímica. Deverá ajudá-lo a orientar seu estudo ou sua revisão. Volte a ela ao longo dos estudos e veja como você adquire conhecimento em bioquímica. GABA, gama-aminobutirato; glicerol-3-P, glicerol-3-fosfato; CoA, coenzima A; TCA, ácido tricarboxílico; cyt, citocromo; FP, flavoproteína; Q, coenzima Q_{10}; ATP, adenosina 5'-trifosfato.

O que este livro é – e o que não é

Na formação médica atual, adquirir conhecimento deve ser a estrutura para o estudo ao longo da carreira. Estudar partes da medicina por meio de especialidades limitadas não vale tanto quanto a aprendizagem integrada, que põe o conhecimento adquirido em um contexto mais amplo. Este livro se presta a fazer o mesmo com a bioquímica.

Tenha em mente que *Bioquímica Médica* não foi concebido como texto de revisão ou fonte didática para preparação para exames de escolha múltipla. Este texto é uma apresentação fortemente orientada para os aspectos clínicos da ciência da bioquímica e base de consulta para a carreira clínica. É menor do que muitos dos grandes volumes de

nossa disciplina e direcionado para a **explicação de conceitos** e **relações-chave** que esperamos que sejam memorizados e utilizados posteriormente na prática clínica.

Ao estudar, relembre que esse é apenas um dos livros-texto disponíveis para estudantes e médicos. *Bioquímica Médica* está também convenientemente interligado a outras fontes, como associações clínicas e diretrizes importantes.

O livro é um vislumbre de um conhecimento em rápida mutação

O que há poucos anos era bioquímica teórica pura é agora parte do vocabulário clínico usado nas rondas de enfermaria e em conferências. Um médico (ou futuro médico) não aprende bioquímica para obter brilhantismo teórico: aprende-a para estar preparado para a futura prática clínica.

Escrevemos o livro *Bioquímica Médica* porque acreditamos que entender bioquímica auxilia na prática da medicina. A pergunta que fizemos a nós mesmos várias vezes durante o processo de escrita foi: "Como esse fragmento de informação pode melhorar o raciocínio clínico?". O texto relaciona constantemente a ciência básica às situações com as quais um médico atarefado se depara com os seus pacientes à cabeceira do leito, no consultório médico e quando pede exames laboratoriais — o que faz quando inicia a prática clínica. Esperamos que os conceitos aprendidos aqui o ajudem nesse momento — e beneficiem seus pacientes.

Leituras sugeridas

Cooke, M., Irby, D. M., Sullivan, W., et al. American medical education 100 years after the Flexner report. *N Engl J Med*. 2006; 355:1339–1344.

Dominiczak, M. H. Teaching and training laboratory professionals for the 21st century. *Clin Chem Lab Med*. 1998; 36:133–136.

Jolly B., Rees L., eds. Medical education in the millennium. Oxford: Oxford University Press, 1998. [pp 1–268].

Ludmerer, K. M. Learner-centered medical education. *N Engl J Med*. 2004; 351:1163–1164.

Tube map, www.tfl.gov.uk/assets/downloads/standard-tube-map.pdf.

CAPÍTULO 2

Aminoácidos e Proteínas

Ryoji Nagai and Naoyuki Taniguchi

Objetivos

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Classificar os aminoácidos com base em sua estrutura química e carga.
- Explicar o significado dos termos pK_a e pI, quando aplicados a aminoácidos e proteínas.
- Descrever os elementos das estruturas primária, secundária, terciária e quaternária das proteínas.
- Descrever os princípios da cromatografia por troca iônica e por filtração em gel, da eletroforese e da focalização isoelétrica, e descrever suas aplicações no isolamento e a caracterização das proteínas.

Introdução

As proteínas são os principais polímeros estruturais e funcionais dos sistemas vivos

As proteínas realizam diversas atividades, como a catálise de reações metabólicas e o transporte de vitaminas, minerais, oxigênio e substâncias combustíveis. Algumas proteínas compõem a estrutura dos tecidos, enquanto outras participam da transmissão nervosa, da contração muscular e da motilidade celular, e outras ainda da coagulação sanguínea, da defesa imunológica ou como hormônios e moléculas reguladoras. As proteínas são sintetizadas como uma sequência de aminoácidos unidos formando uma estrutura poliamídica linear (polipeptídios), porém elas assumem formas tridimensionais complexas para desempenhar suas funções. Há aproximadamente 300 aminoácidos em diversos sistemas animais, vegetais e microbianos, **mas apenas 20 aminoácidos codificados pelo DNA estão presentes nas proteínas**. Muitas proteínas também contêm aminoácidos modificados e componentes acessórios, denominados

grupos prostéticos. Muitas técnicas químicas são empregadas para isolar e caracterizar proteínas empregando uma variedade de critérios, como a massa, a carga e a estrutura tridimensional. A proteômica é uma área emergente que estuda os aspectos globais da expressão das proteínas em uma célula ou um organismo e as modificações da expressão das proteínas em resposta ao crescimento, aos hormônios, ao estresse e ao envelhecimento.

Aminoácidos

Os aminoácidos são os elementos constituintes das proteínas

Estereoquímica: a configuração do carbono α, isômeros D e L

Cada aminoácido tem um carbono central, denominado carbono α, ao qual estão ligados quatro grupos diferentes (Fig. 2.1):

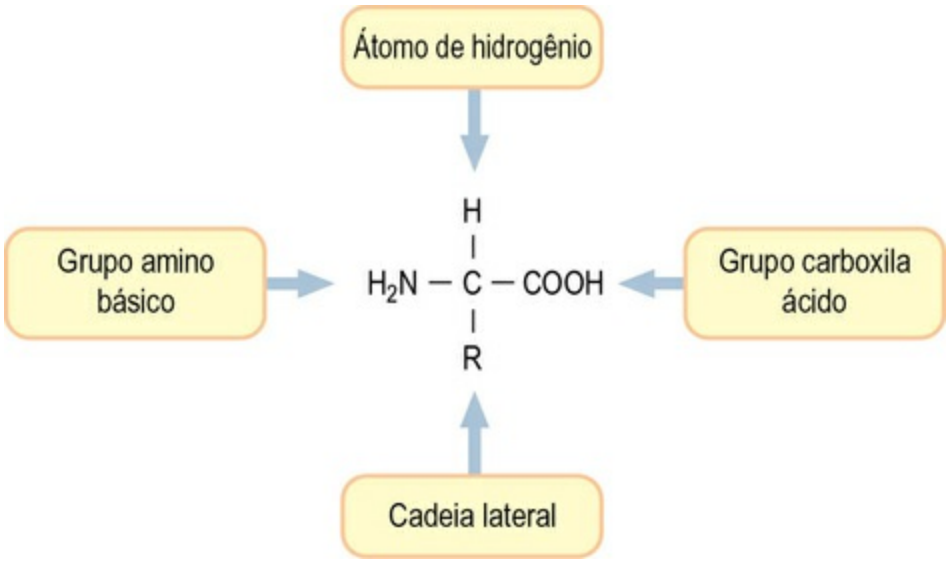


FIG. 2.1 Estrutura de um aminoácido. Com exceção da glicina, há quatro grupos diferentes ligados ao carbono α de um aminoácido. A Tabela 2.1 lista as estruturas dos grupos R.

- um grupo amino básico ($-NH_2$)
- um grupo carboxila ácido ($-COOH$)
- um átomo de hidrogênio ($-H$)
- uma cadeia lateral distinta ($-R$)

Um dos 20 aminoácidos, a prolina, não é um α-aminoácido, mas sim um α-iminoácido (ver adiante). Com exceção da glicina, todos os aminoácidos contêm pelo menos um átomo de carbono assimétrico (o átomo de carbono α), que dá origem a dois isômeros, que são **opticamente ativos**, ou seja, são capazes de promover a rotação do plano da luz polarizada. Esses isômeros, denominados estereoisômeros ou enantiômeros, são ditos

quirais, um termo derivado da palavra grega *kiros*, que significa *mão*. Tais isômeros são imagens especulares não sobreponíveis e são análogos às mãos esquerda e direita, como mostra a Figura 2.2. As duas configurações dos aminoácidos são denominadas D (de *dextro* ou direta) e L (de *levo* ou esquerda). **Todos os aminoácidos nas proteínas estão na configuração L** porque as proteínas são biossintetizadas por enzimas que inserem apenas L-aminoácidos nas cadeias peptídicas.

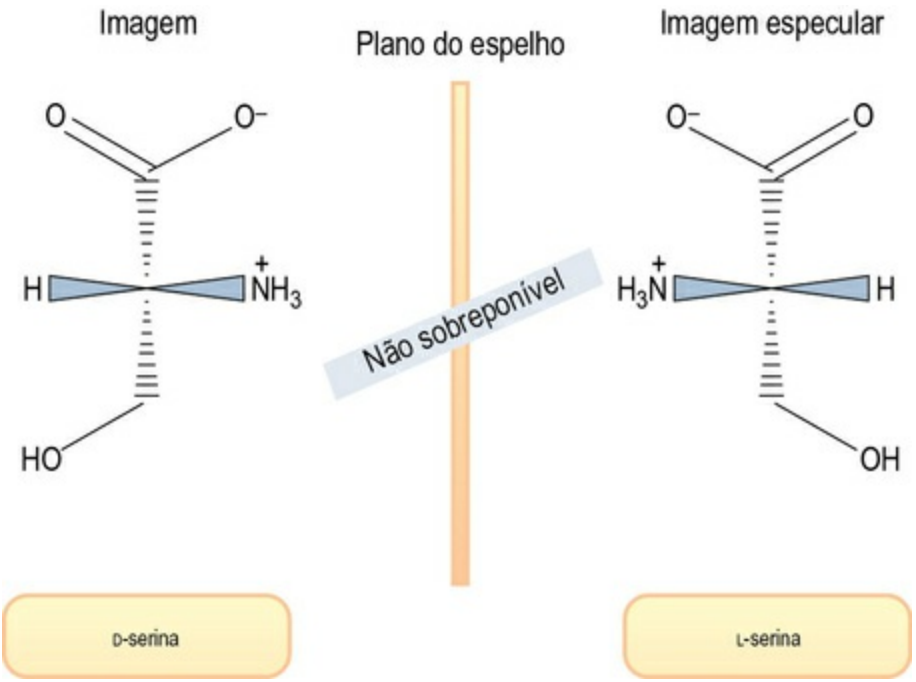


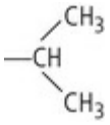
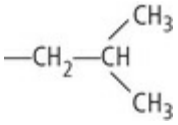
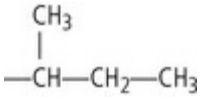
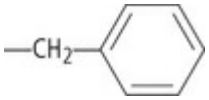
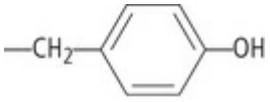
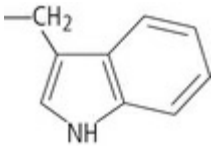
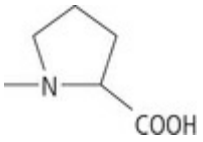
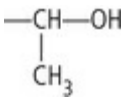
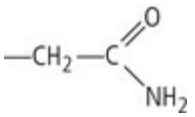
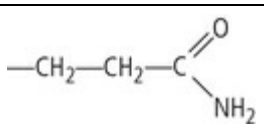
FIG. 2.2 Enantiômeros. O par de imagens especulares dos aminoácidos. Cada aminoácido representa uma imagem especular não sobreponível. Os estereoisômeros da imagem especular são denominados enantiômeros. Apenas os L-enantiômeros estão presentes nas proteínas.

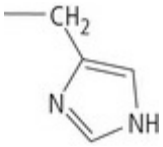
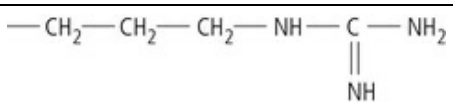
Classificação dos aminoácidos com base na estrutura química de suas cadeias laterais

As propriedades de cada aminoácido dependem de sua cadeia lateral (—R); as cadeias laterais são grupos funcionais que constituem os principais determinantes da estrutura e função das proteínas, assim como da carga elétrica da molécula. O conhecimento das propriedades dessas cadeias laterais é importante para a compreensão dos métodos de análise, purificação e identificação das proteínas. Os aminoácidos com cadeias laterais polares, hidrofílicas ou dotadas de carga estão geralmente expostos na superfície das proteínas. Os resíduos hidrofóbicos apolares costumam estar mergulhados no interior hidrofóbico ou núcleo proteico e fora do contato com a água. Os 20 aminoácidos encontrados nas proteínas, codificados pelo DNA, estão listados na Tabela 2.1 e são classificados de acordo com os grupos funcionais de suas cadeias laterais.

Tabela 2.1

Os 20 aminoácidos encontrados nas proteínas*

Aminoácidos	**Estrutura do radical R**
Aminoácidos alifáticos	
glicina (Gly, **G**)	—H
alanina (Ala, **A**)	$-CH_3$
valina (Val, **V**)	
leucina (Leu, **L**)	
isoleucina (Ile, **I**)	
Aminoácidos que contêm enxofre	
cisteína (Cys, **C**)	$-CH_2-SH$
metionina (Met, **M**)	$-CH_2-CH_2-S-CH_3$
Aminoácidos aromáticos	
fenilalanina (Phe, **F**)	
tirosina (Tyr, **Y**)	
triptofano (Trp, **W**)	
Iminoácido	
prolina (Pro, **P**)	
Aminoácidos neutros	
serina (Ser, **S**)	$-CH_2-OH$
treonina (Thr, **T**)	
asparagina (Asn, **N**)	
glutamina (Gln, **Q**)	
Aminoácidos ácidos	
ácido aspártico (Asp, **D**)	$-CH_2-COOH$
ácido glutâmico (Glu, **E**)	$-CH_2-CH_2-COOH$

Aminoácidos básicos	
histidina (His, **H**)	
lisina (Lys, **K**)	$-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH_2$
arginina (Arg, **R**)	

*As abreviações de uso comum, feitas com três letras e com uma letra, estão entre parênteses.

Aminoácidos alifáticos

Os aminoácidos alanina, valina, leucina e isoleucina, classificados como aminoácidos alifáticos, têm hidrocarbonetos saturados como cadeias laterais. A glicina, que tem apenas um hidrogênio como cadeia lateral, está incluída nesse grupo. A alanina tem uma estrutura relativamente simples, contando com um grupo metil na cadeia lateral, enquanto a leucina e a isoleucina têm grupos secbutil e isobutil, respectivamente. Todos esses aminoácidos têm natureza hidrofóbica.

Aminoácidos aromáticos

A fenilalanina, a tirosina e o triptofano têm cadeias laterais aromáticas

Os aminoácidos aromáticos e alifáticos apolares costumam estar inseridos no núcleo proteico e envolvidos nas interações hidrofóbicas entre eles. A tirosina tem um grupo hidroxila fracamente ácido e pode estar localizada na superfície proteica. A fosforilação reversível do grupo hidroxila da tirosina de algumas enzimas é importante na regulação de vias metabólicas. **Os aminoácidos aromáticos são responsáveis pela absorção da luz ultravioleta na maioria das proteínas, cuja absorção máxima ocorre em torno de 280 nm.** O triptofano apresenta uma absorção maior nessa região quando comparado aos outros dois aminoácidos aromáticos. O coeficiente de absorção molar de uma proteína é útil para a determinação espectrofotométrica de sua concentração em solução. O espectro de absorção característico dos aminoácidos aromáticos está representado na Figura 2.3.

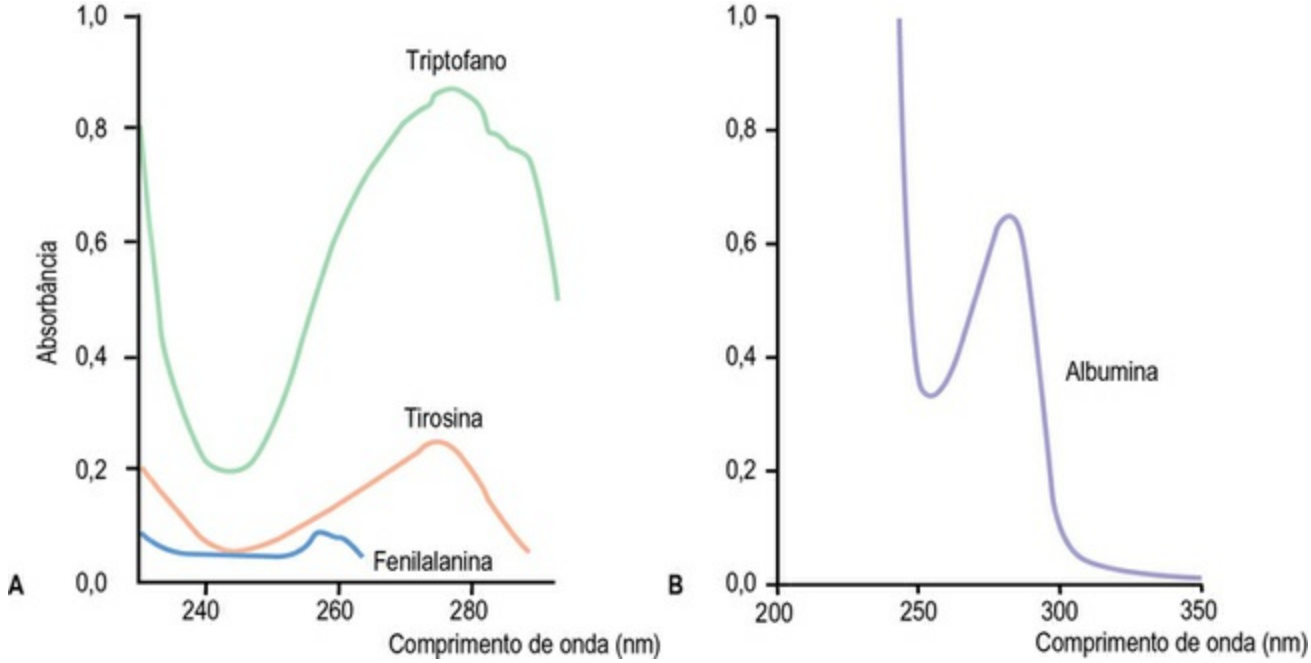


FIG. 2.3 Espectros de absorção da radiação ultravioleta pelos aminoácidos aromáticos e pela albumina sérica bovina. **(A)** Aminoácidos aromáticos, como o triptofano, a tirosina e a fenilalanina, têm absorbância máxima em aproximadamente 280 nm. Cada proteína purificada tem um coeficiente de absorção molecular diferente, por volta de 280 nm, dependendo de seu conteúdo de aminoácidos aromáticos. **(B)** Uma solução de albumina sérica bovina (1 mg dissolvida em 1 mL de água) tem uma absorbância de 0,67 a 280 nm com o uso de uma cubeta de 1 cm. Os coeficientes de absorção das proteínas são frequentemente expressos como $E_{1\%}$ (10 mg/mL de solução). Para a albumina, $E_{1\%280\ nm}$ = 6,7. Embora as proteínas variem em seus conteúdos de Trp, Tyr e Phe, as medidas da absorbância a 280 nm são úteis para a estimativa da concentração de proteínas em solução.

Quadro de conceitos avançados

Aminoácidos não proteicos

Alguns aminoácidos são encontrados nas formas livre ou combinada, mas não em proteínas. A determinação de valores anormais de aminoácidos na urina (aminoacidúria) é útil no diagnóstico clínico (Cap. 19). No plasma, os aminoácidos livres estão presentes numa concentração em torno de 10 a 100 mmol/L, inclusive muitos daqueles que não são encontrados em proteínas. A citrulina, por exemplo, é um importante metabólito da L-arginina e um produto da óxido nítrico sintase, uma enzima que produz óxido nítrico, uma molécula sinalizadora vasoativa importante. A concentração de aminoácidos na urina costuma ser expressa em μmol/g de creatinina. A creatinina é um aminoácido derivado dos músculos e é excretada em quantidades relativamente constantes por unidade de massa corporal por dia. Assim, a concentração da creatinina na urina, normalmente cerca de 1 mg/mL, pode ser utilizada para corrigir a diluição da urina. O aminoácido mais abundante na urina é a glicina, que está presente numa concentração de 400 a 2.000 mg/g de creatinina.

Aminoácidos polares neutros

Os aminoácidos polares neutros têm cadeias laterais com grupos hidroxila ou amida. A serina e a treonina contêm grupos hidroxila. Esses aminoácidos são às vezes encontrados nos sítios ativos de proteínas catalíticas, as enzimas (Cap. 6). A fosforilação reversível de resíduos periféricos de serina e de treonina nas enzimas está também envolvida na regulação do metabolismo energético e no armazenamento de combustível no organismo (Cap. 13). **A asparagina e a glutamina têm cadeias laterais com amida. Esses aminoácidos são polares, mas não apresentam carga nas condições fisiológicas**. A serina, a treonina e a asparagina constituem os sítios primários de ligação dos açúcares às proteínas, formando as glicoproteínas (Cap. 26).

Aminoácidos ácidos

A cadeia lateral dos ácidos aspártico e glutâmico contêm ácidos carboxílicos que estão ionizados em pH 7,0. Em consequência, no estado ionizado esses aminoácidos exibem cargas negativas em seus grupos β e γ-carboxila, respectivamente, sendo chamados nessas condições de aspartato e glutamato.

Aminoácidos básicos

As cadeias laterais da lisina e da arginina estão totalmente protonadas em pH neutro, e, portanto, positivamente carregadas. A lisina contém um grupo amino primário (NH_2) ligado ao carbono ε-terminal da cadeia lateral. O grupo ε-amino da lisina tem pK_a ≈ 11. A arginina é o aminoácido mais básico (pK_a ≈ 13), e seu grupo guanidina encontra-se como íon guanidino protonado em pH 7,0.

A histidina (pK_a ≈ 6) contém um anel **imidazólico** em sua cadeia lateral e atua como um catalisador acidobásico geral em muitas enzimas. A forma protonada do imidazol é denominada íon imidazólio.

Aminoácidos com enxofre

A cisteína e sua forma oxidada, a cistina, são aminoácidos sulfurados que se caracterizam pela baixa polaridade. A cisteína desempenha uma importante função na estabilização da estrutura da proteína, já que participa da formação de pontes dissulfeto com outros resíduos de cisteína, originando resíduos de cistina, que estabelecem ligações cruzadas nas cadeias proteicas e estabilizam a estrutura da proteína. Duas regiões de uma única cadeia polipeptídica, distantes uma da outra na sequência, podem estar ligadas covalentemente por uma ponte dissulfeto (ponte dissulfeto intracadeia). As **pontes dissulfeto** também são formadas entre duas cadeias polipeptídicas (ponte dissulfeto intercadeia), formando dímeros proteicos covalentes. Essas pontes podem ser reduzidas por enzimas ou agentes redutores, como o 2-mercaptoetanol e o ditiotreitol, formando resíduos de cisteína. A metionina é o terceiro aminoácido com enxofre, e sua cadeia lateral apresenta um grupo metil tioéter apolar.

Prolina, um iminoácido cíclico

A prolina é diferente dos outros aminoácidos, uma vez que seu **anel pirrolidínico** da cadeia lateral inclui tanto o grupo α-amino quanto o carbono α. Esse aminoácido força uma curvatura na cadeia polipeptídica, causando, às vezes, alterações abruptas na direção da cadeia.

Classificação dos aminoácidos em função da polaridade de suas cadeias laterais

A Tabela 2.2 retrata os grupos funcionais dos aminoácidos e sua polaridade (hidrofilia). As cadeias laterais polares podem estar envolvidas na ligação do hidrogênio com a água e com outros grupos polares e costumam estar localizadas na superfície da proteína. As cadeias laterais hidrofóbicas contribuem para o dobramento da proteína por meio de interações hidrofóbicas e estão localizadas, principalmente, no núcleo proteico ou nas superfícies envolvendo interações com outras proteínas.

Tabela 2.2

Resumo dos grupos funcionais dos aminoácidos e suas polaridades

Aminoácidos	Grupo funcional	Hidrofílico (polar) ou hidrofóbico (apolar)	Exemplos
ácidos	carboxila, –COOH	polar	Asp, Glu
básicos	amina, $-NH_2$	polar	Lys
	imidazol	polar	His
	guanidino	polar	Arg
neutros	glicina, –H	apolar	Gly
	amidas, $-CONH_2$	polar	Asn, Gln
	hidroxila, –OH	polar	Ser, Thr
	sulfidrila, –SH	apolar	Cys
alifáticos	hidrocarboneto	apolar	Ala, Val, Leu, Ile, Met, Pro
aromáticos	anéis de C	apolar	Phe, Trp, Tyr

Estado de ionização de um aminoácido

Os aminoácidos são moléculas anfóteras — possuem tanto um grupo básico quanto um grupo ácido

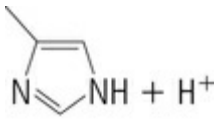
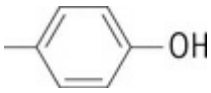
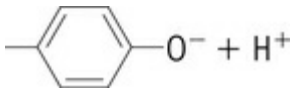
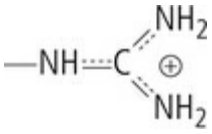
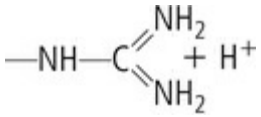
Os ácidos monoamino e monocarboxílicos ionizam-se de maneiras diferentes, dependendo do pH da solução. Em pH 7,0, o *zwitterion* $^{+}H_3N–CH_2–COO^{-}$ é a espécie predominante da glicina em solução, e a molécula é, portanto, eletricamente neutra (carga líquida = zero). Na titulação em pH ácido, o grupo α-amino está protonado e positivamente carregado, produzindo o cátion $^{+}H_3N–CH_2–COOH$, enquanto a titulação com um álcali produz a espécie aniônica $H_2N–CH_2–COO^{-}$.

$$^{+}H_3N\ CH_2\ COOH \overset{H^+}{\rightleftarrows} {}^{+}H_3N\ CH_2\ COO^- \overset{OH^-}{\rightleftarrows} H_2N\ CH_2\ COO^-$$

A Tabela 2.3 mostra os valores de pK_a para os grupos α-amino e α-carboxila e para as cadeias laterais dos aminoácidos ácidos e básicos. A carga global de uma proteína depende da contribuição dos aminoácidos básicos (carga positiva) e ácidos (carga negativa), mas a carga real varia com o pH da solução. Para entender como as cadeias laterais afetam a carga das proteínas, vale a pena rever a equação de Henderson-Hasselbalch.

Tabela 2.3

Valores de pK_a típicos dos grupos ionizáveis das proteínas

Grupo	Ácido (forma protonada) (ácido conjugado)	H^+ + Base (forma desprotonada) (base conjugada)	pK_a
resíduo com carboxila terminal (α-carboxila)	–COOH (ácido carboxílico)	$-COO^- + H^+$ (carboxilato)	3,0-5,5
ácido aspártico (β-carboxila)	–COOH	$-COO^- + H^+$	3,9
ácido glutâmico (γ-carboxila)	–COOH	$-COO^- + H^+$	4,3
histidina (imidazol)			6,0
	(imidazólio)	(imidazol)	
aminoterminal (α-amino)	$-NH_3^+$ (amônio)	$-NH^+ + H^+$ (amina)	8,0
cisteína (sulfidrila)	–SH (tiol)	$-S^- + H^+$ (tiolato)	8,3
tirosina (hidroxila fenólica)			10,1
	(fenol)	(fenolato)	
lisina (ε-amino)	$-NH_3^+$	$-NH_2 + H^+$	10,5
arginina (guanidino)			12,5
	(guanidínio)	(guanidino)	

Os valores reais de pK_a podem variar tanto quanto em três unidades de pH, dependendo da temperatura, do tampão, da união com um ligante e, principalmente, dos grupos funcionais vizinhos na proteína.

Equação de Henderson-Hasselbalch e pK_a

A equação de Henderson-Hasselbalch descreve a titulação de um aminoácido e pode

ser usada para prever a carga líquida e o ponto isoelétrico de uma proteína

A dissociação geral de um ácido fraco, como um ácido carboxílico, é dada pela equação:

$$HA \rightleftarrows H^+ + A^-$$

em que HA é a forma protonada (ácido conjugado ou forma associada) e A^- é a forma desprotonada (base conjugada ou forma dissociada). **(1)**

A constante de dissociação (K_a) de um ácido fraco é definida como a constante de equilíbrio da reação de dissociação do ácido (1):

$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}$$

A concentração do íon hidrogênio $[H^+]$ de uma solução de um ácido fraco pode ser calculada conforme mostrado a seguir. A equação 2 pode sofrer rearranjo: **(2)**

$$[H^+] = K_a \times \frac{[HA]}{A^-}$$

A equação 3 pode ser expressa em função do logaritmo negativo: **(3)**

$$-\log[H^+] = -\log K_a - \log\frac{[HA]}{[A^-]}$$

Como o pH é o logaritmo negativo da $[H^+]$, ou seja, $-\log[H^+]$ e pK_a é igual ao logaritmo negativo da constante de dissociação de um ácido fraco, isto é, $-\log K_a$, a equação de Henderson-Hasselbalch (5) pode ser desenvolvida e utilizada na análise de sistemas de equilíbrio acidobásico: **(4)**

$$pH = pK_a + \log\frac{[A^-]}{[HA]}$$

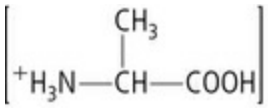
Para uma base fraca, como uma amina, a reação de dissociação pode ser escrita como: **(5)**

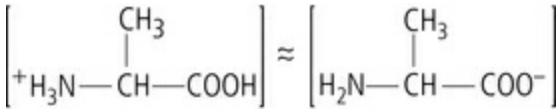
$$RNH_3^+ \rightleftarrows H^+ + RNH_2$$

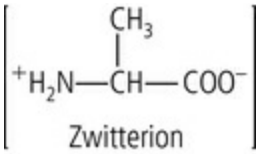
e a equação de Henderson-Hasselbalch torna-se: **(6)**

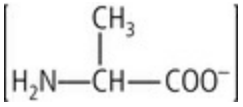
$$pH = pK_a + \log\frac{[RNH_2]}{[RNH_3^+]}$$

A partir das equações 5 e 7, torna-se evidente que o grau de protonação dos grupos funcionais ácidos e básicos e, portanto, a carga líquida, variará com o pK_a do grupo funcional e com o pH da solução. Para a alanina, que tem dois grupos funcionais com pK_a = 2,4 e 9,8, respectivamente (Fig. 2.4), a carga líquida varia com o pH, de +1 a –1. Em um valor de pH intermediário entre pK_{a1} e pK_{a2}, a alanina tem carga líquida zero. Esse pH é chamado de ponto isoelétrico, pI (Fig. 2.4). **(7)**









$$pI = \frac{pK_{a1} + pK_{a2}}{2} = \frac{2,4 + 9,8)}{2} = 6,1$$

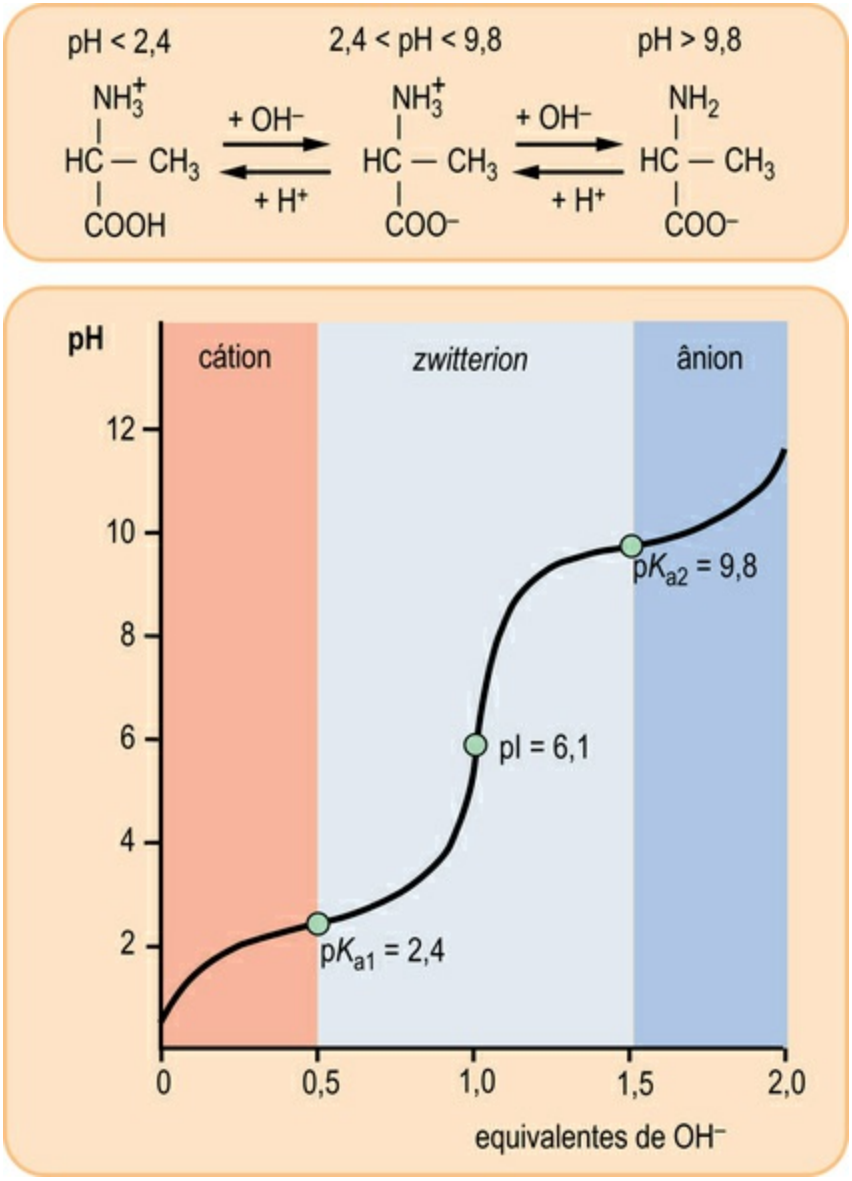


FIG. 2.4 Titulação de um aminoácido. A curva mostra o número de equivalentes de NaOH consumidos pela alanina durante a titulação da solução de pH 0 até pH 12. A alanina contém dois grupos ionizáveis: um grupo α-carboxila e um grupo α-amino. Conforme a NaOH é adicionada, esses dois grupos são titulados. O pK_a do grupo α-COOH é 2,4, enquanto o pK_a do grupo α-NH_3^+ é 9,8. Em pH muito baixo, a espécie iônica predominante da alanina é a forma catiônica totalmente protonada:

No ponto médio do primeiro estágio de titulação (pH 2,4), estão presentes concentrações equimolares das espécies doadora de próton e aceptora de próton, fornecendo bom poder de tamponamento.

No ponto médio da titulação global, pH 6,1, o *zwitterion* é a forma predominante do aminoácido em solução. Nesse valor de pH, o aminoácido tem uma carga líquida nula — sendo a carga negativa do íon carboxilato neutralizada pela carga positiva do grupo amônio.

O segundo estágio de titulação corresponde à remoção do próton do grupo $–NH_3^+$ da alanina. O pH do ponto médio desse estágio é 9,8, igual ao pK_a para o grupo $–NH_3^+$. A titulação está completa num valor de pH de aproximadamente 12, no qual a forma predominante de alanina é a não protonada, aniônica:

O pH no qual a molécula não apresenta carga líquida é conhecido como seu ponto isoelétrico, pI. Para a alanina, é calculado como:

Tampões

Os aminoácidos e as proteínas são excelentes tampões em condições fisiológicas

Os tampões são soluções que minimizam a alteração da [H^+], ou seja, do pH, quando há adição de um ácido ou de uma base. Uma solução tampão, contendo um ácido fraco ou uma base fraca e um contraíon, tem capacidade máxima de tamponamento no seu pK_a, isto é, quando as formas ácida e básica estão presentes em concentrações iguais. A forma protonada, ácida, reage com a base adicionada, e a forma básica, desprotonada, neutraliza o ácido que foi adicionado, conforme mostrado a seguir para uma substância contendo um grupo amina:

$$RNH_3^+ + OH^- \rightleftarrows RNH_2 + H_2O$$

$$RNH_2 + H^+ \rightleftarrows RNH_3^+$$

Uma solução de alanina (Fig. 2.4) apresenta capacidade de tamponamento máximo quando seu pH é igual a 2,4 e 9,8, ou seja, no pK_a dos grupos carboxila e amino, respectivamente. Quando dissolvida em água, a alanina transforma-se em um íon dipolar, ou *zwitterion*, no qual o grupo carboxila está desprotonado ($-COO^-$) e o grupo amino está protonado ($-NH_3^+$). O pH da solução é 6,1, que corresponde ao pI, valor intermediário entre o pK_a do grupo amino e do grupo carboxila. A curva de titulação da alanina com NaOH (Fig. 2.4) mostra que a alanina apresenta capacidade mínima de tamponamento no seu pI e capacidade de tamponamento máxima no pH igual ao pK_{a1} ou ao pK_{a2}.

Peptídios e proteínas

Estrutura primária das proteínas

A estrutura primária das proteínas consiste na sequência linear dos aminoácidos

Nas proteínas, o grupo carboxila de um aminoácido está ligado ao grupo amino do aminoácido seguinte, formando uma ligação amídica (peptídica); uma molécula de água é eliminada durante a reação (Fig. 2.5). As unidades aminoacídicas de uma cadeia peptídica são chamadas de resíduos de aminoácidos. Uma cadeia peptídica formada por três resíduos de aminoácidos é denominada tripeptídio como a glutationa, na Figura 2.6. Por convenção, o grupo aminoterminal (*N*-terminal) é considerado o primeiro resíduo da sequência, escrita da esquerda para a direita. Ao se escrever uma sequência peptídica, utiliza-se a abreviatura para os aminoácidos composta de três letras ou de uma letra, como: Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu ou D-R-V-Y-I-H-P-F-H-L (Tabela 2.1). Esse

peptídio exemplificado é a angiotensina, um hormônio peptídico que afeta a pressão sanguínea. O resíduo de aminoácido que tem um grupo amino livre na extremidade do peptídio, o Asp, é denominado aminoácido *N*-terminal (aminoterminal), enquanto o resíduo com um grupo carboxila livre na outra extremidade, a Leu, é chamado de aminoácido *C*-terminal (carboxila terminal). As proteínas contêm entre 50 e 2.000 resíduos de aminoácidos. A massa molecular média de um resíduo de aminoácido é de cerca de 110 dáltons (Da). Portanto, a massa molecular da maioria das proteínas está entre 5.500 e 220.000 Da. A anidrase carbônica I humana, uma enzima que desempenha importante papel no equilíbrio acidobásico do sangue (Cap. 24), é uma proteína com massa molecular de 29.000 Da (29 kDa).

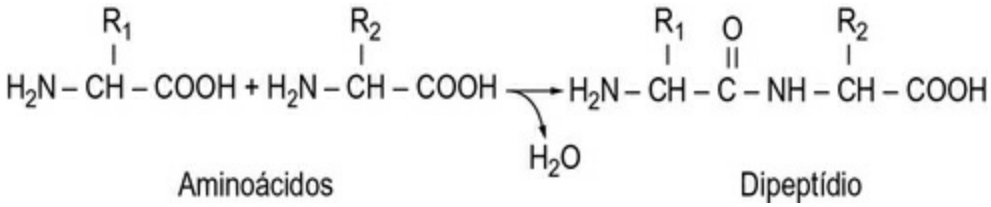


FIG. 2.5 Estrutura de uma ligação peptídica.

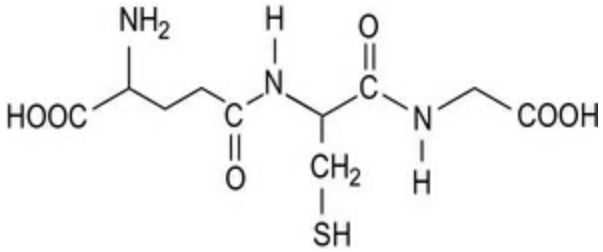


FIG. 2.6 Estrutura da glutationa.

Quadro de conceitos avançados

Glutationa

A glutationa (GSH) é um tripeptídio com a sequência γ-glutamil-cisteinil-glicina (Fig. 2.6). Quando o grupo tiol da cisteína é oxidado, forma-se o dissulfeto GSSG. A GSH é o principal peptídio presente na célula. No fígado, a concentração de GSH é de ~5 mmol/L. A GSH desempenha uma importante função na manutenção dos resíduos de cisteína das proteínas em suas formas reduzidas (sulfidrila) e nas defesas antioxidantes (Cap. 37). A enzima γ-glutamil transpeptidase está envolvida no metabolismo da glutationa e é um biomarcador plasmático de algumas doenças hepáticas, como o carcinoma hepatocelular e a doença hepática alcoólica.

As cadeias laterais dos aminoácidos contribuem tanto para a carga quanto para a hidrofobia das proteínas

A composição dos aminoácidos de uma cadeia peptídica tem um efeito profundo sobre as suas propriedades físicas e químicas. As proteínas ricas em grupamentos amina-alifáticos ou aromáticos são relativamente insolúveis em água, sendo mais provável encontrá-los nas membranas celulares. As proteínas ricas em aminoácidos polares são mais solúveis em água. As amidas são compostos neutros, de modo que o esqueleto amídico de uma proteína, formado pelos grupos α-amino e α-carboxila, não contribui para a carga da proteína. Ao contrário, a carga da proteína depende dos grupos funcionais das cadeias laterais dos aminoácidos. Os aminoácidos com grupos ácidos (Glu, Asp) ou básicos (Lys, His, Arg) em suas cadeias laterais é que conferirão a carga e a capacidade de tamponamento a uma proteína. O equilíbrio entre as cadeias laterais ácidas e básicas de uma proteína determina seu ponto isoelétrico (pI) e sua carga líquida em solução. As proteínas ricas em lisina e arginina são básicas quando em solução e têm uma carga positiva em pH neutro, enquanto as proteínas ácidas, ricas em resíduos de aspartato e glutamato, são ácidas e têm uma carga negativa. Devido aos grupos funcionais de suas cadeias laterais, todas as proteínas tornam-se mais positivas em pH ácido e mais negativas em pH básico. As proteínas são uma parte importante da capacidade de tamponamento das células e dos fluidos biológicos, como o sangue.

A estrutura secundária das proteínas

A estrutura secundária de uma proteína destaca-se pelas interações de pontes de hidrogênio entre grupos funcionais das cadeias laterais dos aminoácidos

A estrutura secundária de uma proteína refere-se a uma estrutura local da cadeia polipeptídica. Essa estrutura é determinada por interações por pontes de hidrogênio entre o oxigênio do grupo carbonila de uma ligação peptídica e o hidrogênio amídico de outra ligação peptídica vizinha. Há dois tipos de estrutura secundária: a α-hélice e a folha pregueada β.

A α-hélice

A α-hélice é uma estrutura cilíndrica formada pelo firme enrolamento da cadeia peptídica, com as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos projetadas para fora do eixo da espiral. Cada grupo carbonila de uma amida está ligado por uma ponte de hidrogênio ao hidrogênio da amida de uma ligação peptídica distante quatro resíduos na mesma cadeia. Há, em média, 3,6 resíduos de aminoácidos por volta da hélice, e a hélice enrola-se para a direita (no sentido horário) em quase todas as proteínas naturais (Fig. 2.7A).

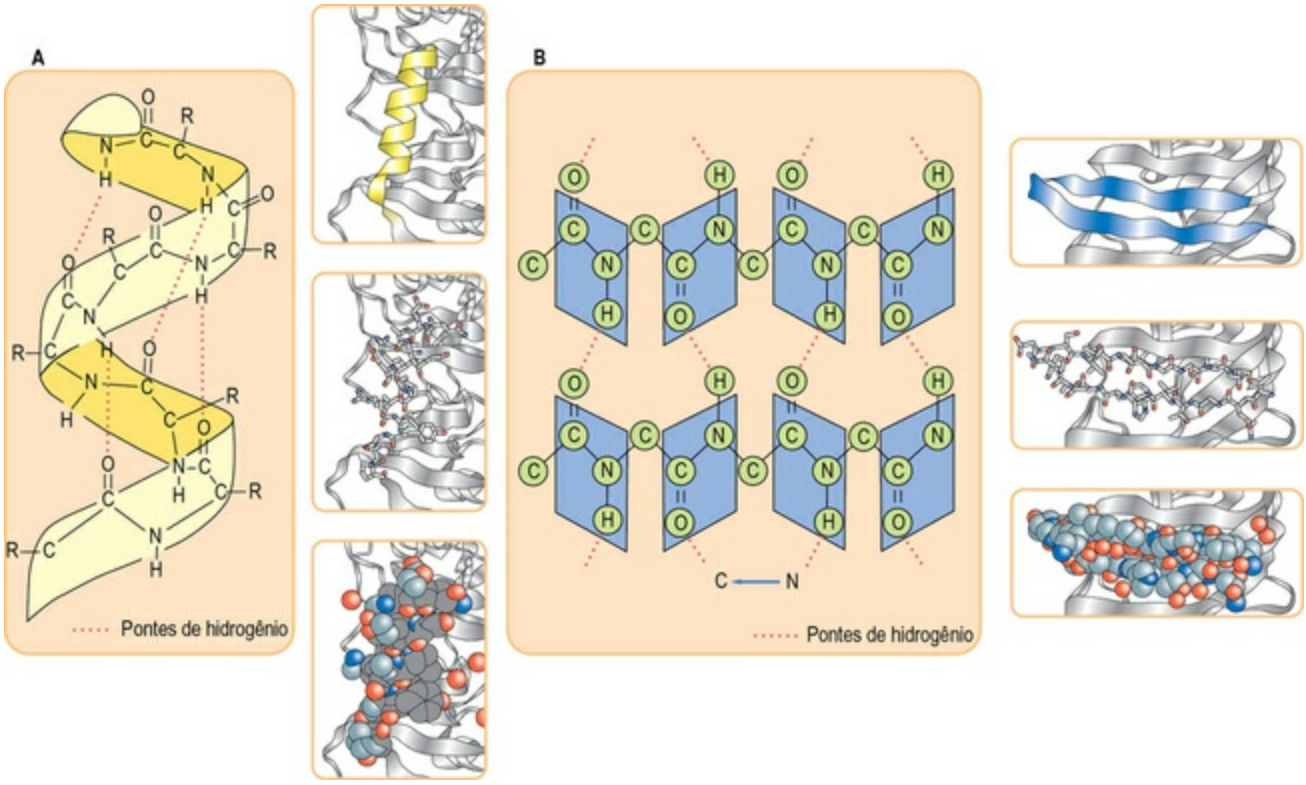


FIG. 2.7 Arranjos ou motivos *(motifs)* da estrutura secundária das proteínas. **(A)** Estrutura secundária em α-hélice. As pontes de hidrogênio entre o grupo NH e o grupo C = O das amidas do "esqueleto" proteico estabilizam a α-hélice. Os átomos de hidrogênio dos grupos OH, NH ou SH (doadores de hidrogênio) interagem com os pares de elétrons dos átomos aceptores, como O, N ou S. Embora a energia de ligação seja mais baixa do que a das ligações covalentes, as pontes de hidrogênio desempenham um papel fundamental na estabilização das moléculas proteicas. R: grupos laterais dos aminoácidos que se estendem para fora a partir da hélice. A figura mostra os modelos em fita, varetas e bolas e espaço preenchido. **(B)** Estrutura secundária em folha β paralela. Na conformação β, o esqueleto da cadeia polipeptídica está disposto em forma em zigue-zague. Quando as cadeias polipeptídicas em zigue-zague dispõem-se lado a lado, formam uma estrutura que se assemelha a uma série de pregas. A figura também mostra os modelos em fita, varetas e bolas e espaço preenchido.

Folha pregueada β

Se as pontes de hidrogênio se formarem lateralmente entre cadeias peptídicas, as sequências polipeptídicas adquirem uma disposição paralela ou antiparalela umas em relação às outras, naquela que é comumente denominada folha pregueada β. A folha pregueada β é uma estrutura estendida, diferentemente da estrutura enrolada da α-hélice. É pregueada porque as ligações carbono-carbono (C–C) são tetraédricas e não podem existir em uma configuração planar. Se a cadeia polipeptídica segue na mesma direção, forma-se uma folha β paralela (Fig. 2.7B), mas, se apresenta direções opostas, origina-se uma estrutura antiparalela. A volta β (β-*turn*) ou curvatura β (β-*bend*) refere-se ao segmento do polipeptídio em que ocorre uma inversão abrupta de direção. Resíduos de glicina (Gly) e de prolina (Pro) costumam estar presentes nas voltas β na superfície das proteínas globulares.

Quadro de conceitos avançados

Colágeno

Os defeitos genéticos humanos que envolvem o colágeno ilustram a estreita relação entre a sequência de aminoácidos e a estrutura tridimensional. Os colágenos constituem a família de proteínas mais abundante do corpo dos mamíferos e representam cerca de um terço das proteínas do corpo. Os colágenos são os principais componentes do tecido conjuntivo, como a cartilagem, os tendões, a matriz orgânica dos ossos e a córnea dos olhos.

Comentário. O colágeno contém 35% de Gly, 11% de Ala e 21% de Pro e Hyp (hidroxiprolina). A sequência dos aminoácidos do colágeno geralmente consiste em uma unidade tripeptídica repetitiva, Gly-Xaa-Pro ou Gly-Xaa-Hyp, na qual Xaa pode ser qualquer aminoácido; Hyp = hidroxiprolina. Essa sequência repetitiva adota uma estrutura helicoidal anti-horária com três resíduos por volta. Três dessas hélices enrolam-se entre si no sentido horário. A molécula resultante, composta por três fitas, é denominada tropocolágeno. As moléculas de tropocolágeno autoagrupam-se em fibrilas de colágeno que são mantidas juntas para formar as fibras de colágeno. Existem distúrbios metabólicos e genéticos que resultam de anormalidades do colágeno. O escorbuto, a osteogênese imperfeita (Cap. 28) e a síndrome de Ehlers-Danlos resultam de defeitos na síntese e/ou nas ligações cruzadas do colágeno. Deslocamento do cristalino na homocistinúria (incidência: 1 em 350.000).

A estrutura terciária das proteínas

A estrutura terciária de uma proteína é determinada pelas interações entre grupos funcionais das cadeias laterais, como pontes dissulfeto, pontes de hidrogênio, pontes salinas e interações hidrofóbicas

A conformação tridimensional, enovelada e biologicamente ativa de uma proteína é denominada estrutura terciária. Essa estrutura reflete a forma global da molécula e geralmente consiste em várias unidades dobradas menores denominadas **domínios**. A estrutura terciária das proteínas é determinada por cristalografia por raios X e espectroscopia por ressonância nuclear magnética.

A estrutura terciária de uma proteína é estabilizada por interações entre os grupos funcionais das cadeias laterais: ligações dissulfeto covalentes, pontes de hidrogênio, pontes salinas e interações hidrofóbicas (Fig. 2.8). As cadeias laterais do triptofano e a da arginina atuam como doadoras de hidrogênio, enquanto as cadeias laterais da asparagina, da glutamina, da serina e da treonina podem atuar tanto como doadoras quanto como aceptoras de hidrogênio. A lisina, o ácido aspártico, o ácido glutâmico, a tirosina e a histidina também podem atuar tanto como doadores quanto como aceptores na formação dos pares iônicos (pontes salinas). Dois aminoácidos de cargas opostas, como o glutamato com um grupo γ-carboxila e a lisina com um grupo ε-amino, podem formar uma ponte salina, principalmente na superfície das proteínas (Fig. 2.8).

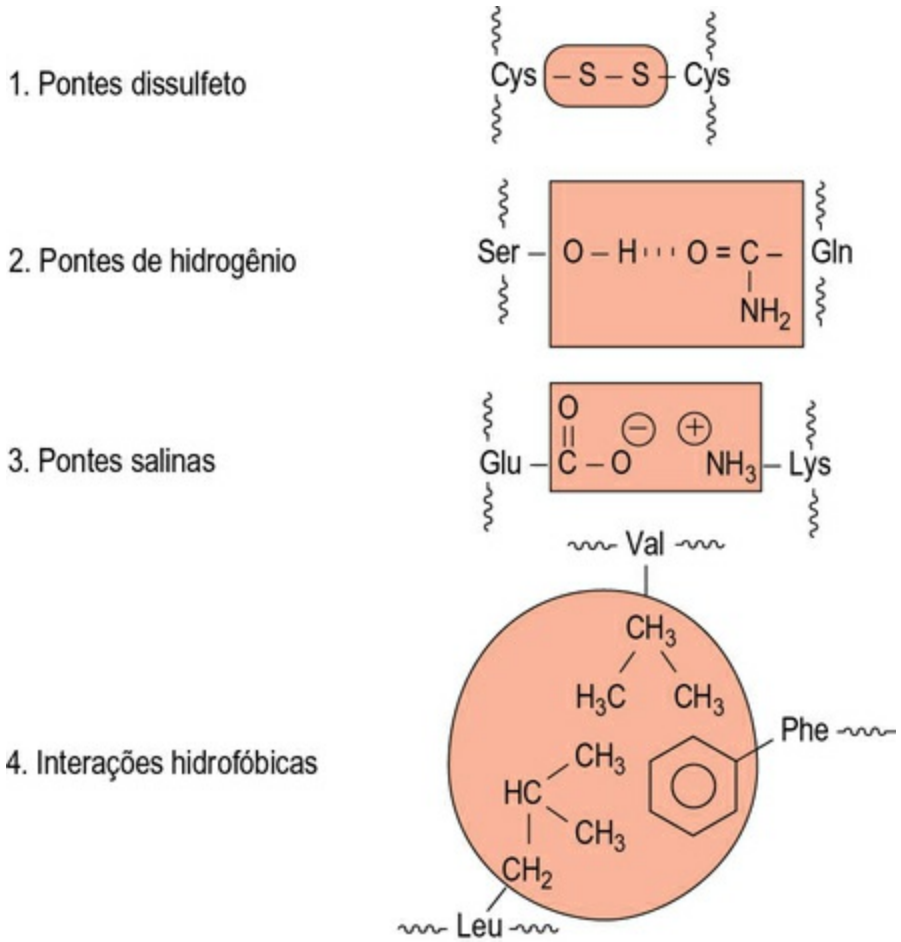


FIG. 2.8 Elementos da estrutura terciária das proteínas. Exemplos de interações entre os grupos laterais dos aminoácidos que contribuem para a estrutura terciária.

Quadro de conceitos avançados

Deslocamento do cristalino na homocistinúria (incidência de 1 em 200.000)

A manifestação ocular mais comum da homocistinúria, um defeito no metabolismo de aminoácidos sulfurados (Cap. 19), é o deslocamento do cristalino, que ocorre por volta dos 10 anos. A fibrilina, encontrada nas fibras que sustentam o cristalino, é rica em resíduos de cisteína. As pontes dissulfeto entre esses resíduos são necessárias para que ocorram ligações cruzadas e a estabilização da proteína e da estrutura do cristalino. A homocisteína, um intermediário metabólico e homólogo da cisteína, é capaz de romper essas ligações por troca de dissulfetos dependentes da homocisteína.

Outro distúrbio relacionado a aminoácido sulfurado e igualmente raro — a deficiência de sulfito oxidase — também está associado ao deslocamento do cristalino causado por um mecanismo similar (em geral presente no nascimento, com convulsões neonatais refratárias precoces). A síndrome de Marfan, também associada ao deslocamento do cristalino, está relacionada a mutações no gene da fibrilina (Cap. 29).

Compostos como a ureia e o hidrocloridrato de guanidina causam a desnaturação ou a perda das estruturas secundária e terciária quando presentes em altas concentrações, como 8 mol/L de ureia. Esses reagentes são chamados de **agentes desnaturantes** ou

caotrópicos.

A estrutura quaternária das proteínas é formada por interações entre as cadeias peptídicas

A estrutura quaternária de proteínas contendo mais de uma subunidade é determinada por interações covalentes e não covalentes entre as superfícies das subunidades

A estrutura quaternária é formada por um complexo ou reunião de duas ou mais cadeias peptídicas separadas mantidas juntas por interações não covalentes ou, em alguns casos, covalentes. Em geral, a maioria das proteínas com mais de 50 kDa tem mais de uma cadeia e é classificada como proteínas diméricas, triméricas ou multiméricas. Muitas proteínas formadas por várias subunidades são compostas de diferentes tipos de **subunidades funcionais, como as subunidades reguladora e catalítica**. A hemoglobina é uma proteína tetramérica (Cap. 5), e a ATPase mitocondrial do coração bovino tem 10 protômeros (Cap. 9). A menor unidade é denominada monômero ou subunidade. A Figura 2.9 mostra a estrutura da proteína dimérica Cu, Zn-superóxido dismutase. A Figura 2.10 apresenta uma visão geral das estruturas primária, secundária, terciária e quaternária de uma proteína tetramérica.

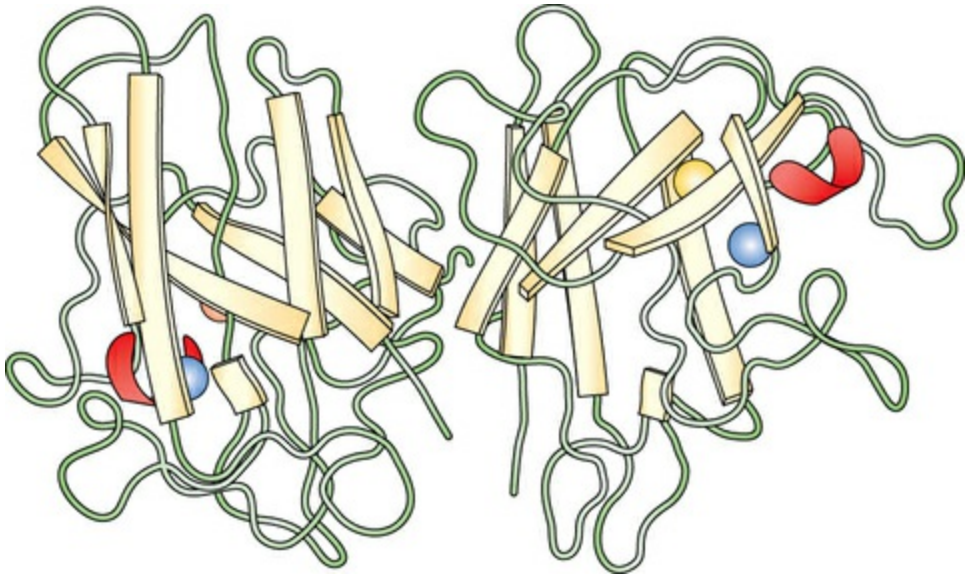


FIG. 2.9 Estrutura tridimensional de uma proteína dimérica. Estrutura quaternária da Cu, Zn-superóxido dismutase do espinafre. A Cu, Zn-superóxido dismutase tem uma estrutura dimérica, com massa molecular de 16.000 Da para cada monômero. Cada subunidade consiste em oito folhas β pregueadas antiparalelas denominadas estrutura em barril β, em analogia aos motivos geométricos encontrados nos tecidos e na cerâmica dos nativos norte-americanos e dos gregos. Arco vermelho = ponte dissulfeto intracadeia. Cortesia de Dr. Y. Kitagawa.

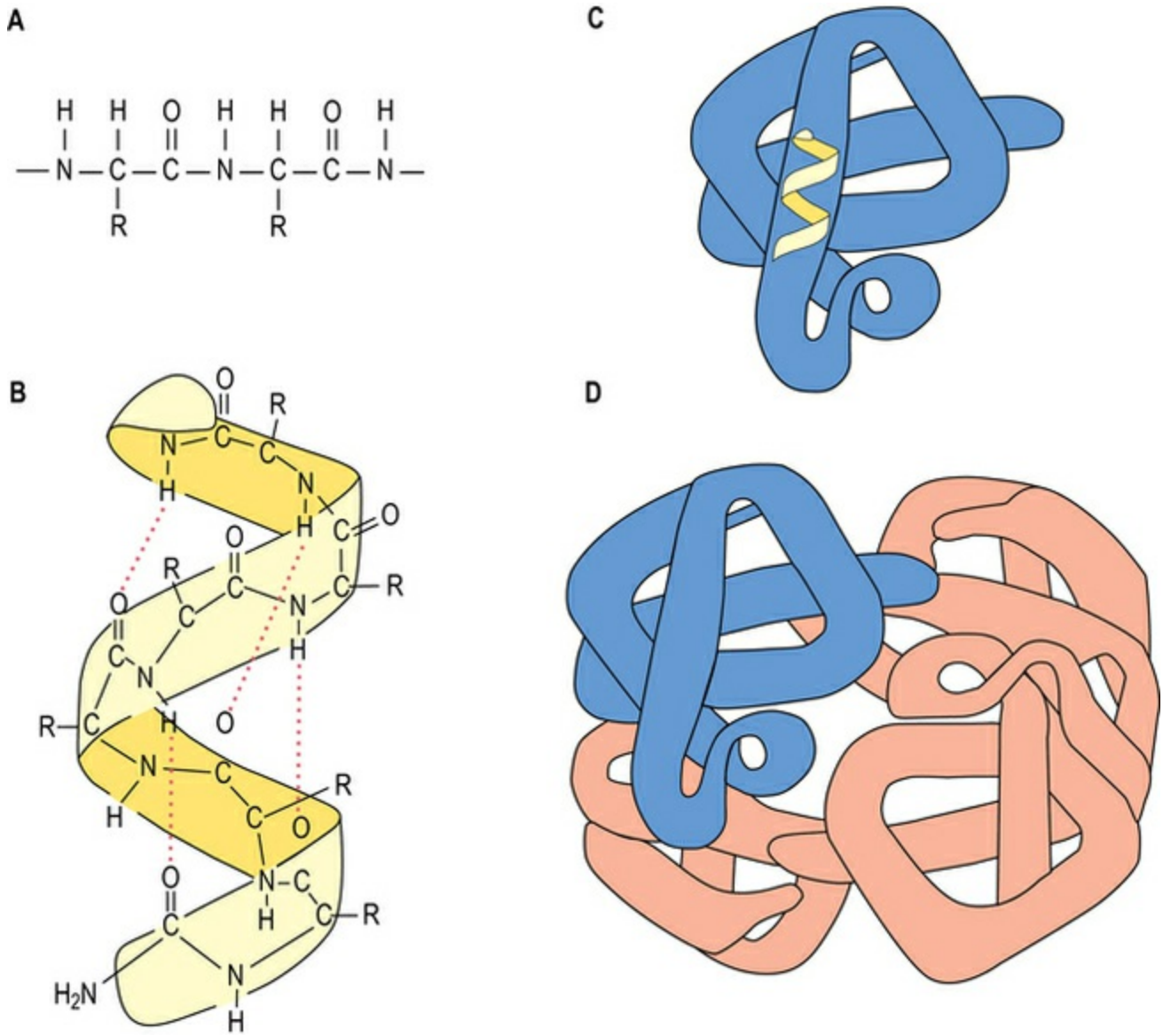


FIG. 2.10 Estruturas primária, secundária, terciária e quaternária. **(A)** A estrutura primária é composta de uma sequência linear de resíduos de aminoácidos das proteínas. **(B)** A estrutura secundária indica o arranjo espacial local do esqueleto polipeptídico que produz uma estrutura em α-hélice estendida ou em folha pregueada β, conforme representado pelo modelo em fita. As ligações de hidrogênio entre o grupo –NH– e o grupo C=O das amidas do "esqueleto" proteico estabilizam a hélice. **(C)** A estrutura terciária ilustra a conformação tridimensional de uma subunidade da proteína, enquanto a estrutura quaternária **(D)** mostra a reunião de múltiplas cadeias polipeptídicas formando uma proteína tetramérica, íntegra.

Purificação e caracterização das proteínas

A purificação de proteínas é um processo com várias etapas, com base em tamanho, carga, solubilidade e ligação com ligantes

Os procedimentos para a purificação das proteínas apoiam-se em técnicas de separação baseadas na carga, no tamanho, nas propriedades de ligação e na solubilidade. A caracterização completa de uma proteína requer o conhecimento da composição de seus aminoácidos e de suas estruturas primária, secundária e terciária completas e, para as proteínas multiméricas, de sua estrutura quaternária.

A fim de caracterizar uma proteína, é necessário primeiramente purificá-la, separando-

a dos outros componentes nas misturas biológicas complexas. Geralmente, a fonte das proteínas é o sangue ou os tecidos, ou células microbianas como as bactérias e as leveduras. Em primeiro lugar, as células ou os tecidos são rompidos por trituração ou homogeneização em soluções isotônicas tamponadas, comumente em pH fisiológico e a 4°C para minimizar a desnaturação das proteínas durante a purificação. Assim, o "extrato bruto" contendo organelas como núcleos, mitocôndrias, lisossomos, microssomos e frações do citosol pode ser fracionado por centrifugação em alta velocidade ou ultracentrifugação. As proteínas que estão fortemente ligadas a outras biomoléculas ou às membranas podem ser solubilizadas utilizando solventes orgânicos ou detergentes.



Quadro de conceitos avançados

Modificações pós-traducionais das proteínas

A maioria das proteínas sofre algum tipo de modificação enzimática após a síntese da cadeia peptídica. As modificações "pós-traducionais" são realizadas por enzimas do retículo endoplasmático, do complexo de Golgi, de grânulos secretórios e do espaço extracelular. As modificações envolvem clivagem proteolítica, glicosilação, adição de lipídios e fosforilação. A espectrometria de massas é uma ferramenta poderosa para detectar tais modificações e baseia-se em diferenças na massa molecular (Cap. 35).

Salting-out (fracionamento com sulfato de amônio) e ajuste do pH

A solubilidade de uma proteína depende da concentração dos sais dissolvidos

A solubilidade de uma proteína pode ser aumentada pela adição de um sal em baixa concentração (*salting-in*) ou diminuída por alta concentração salina (*salting-out*). Quando o sulfato de amônio, um dos sais mais solúveis, é adicionado a uma solução proteica, algumas proteínas precipitam-se em uma dada concentração do sal, enquanto outras não. As imunoglobulinas séricas humanas precipitam-se em $(NH_4)_2SO_4$ saturado a 33-40%, enquanto a albumina permanece solúvel. A concentração do sulfato de amônio saturado é de, aproximadamente, 4,1 mol/L. A maioria das proteínas precipita-se em uma solução de $(NH_4)_2SO_4$ saturado a 80%.

As proteínas podem também ser precipitadas a partir da solução, ajustando o pH. Geralmente, as proteínas são menos solúveis em seu ponto isoelétrico (pI). Nesse pH, a proteína não apresenta carga líquida nem repulsão eletrostática entre subunidades. As interações hidrofóbicas entre superfícies proteicas podem conduzir à agregação e à precipitação da proteína.

Separação com base no tamanho

Diálise e ultrafiltração

Moléculas pequenas, como os sais, podem ser removidas de soluções proteicas por meio de diálise ou por ultrafiltração

A diálise é realizada colocando-se a solução de proteína contendo sal em um tubo formado por uma membrana semipermeável (geralmente uma membrana de nitrocelulose ou colódio). Quando esse tubo é imerso em uma solução-tampão diluída, as moléculas pequenas passam através da membrana e as moléculas proteicas grandes ficam retidas no interior do tubo, dependendo do tamanho dos poros da membrana utilizada na diálise. Esse procedimento é particularmente útil para a remoção de $(NH_4)_2SO_4$ ou outros sais durante a purificação das proteínas, uma vez que os sais interferem no processo de purificação delas na cromatografia por troca iônica (a seguir). A Figura 2.11 ilustra a diálise de proteínas.

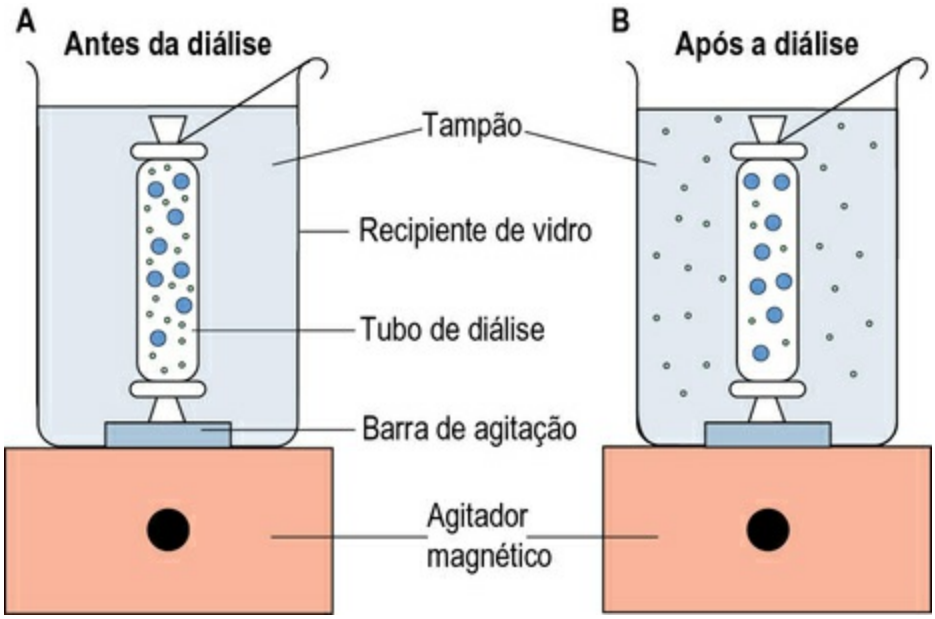


FIG. 2.11 Diálise de proteínas. Proteínas e compostos com baixa massa molecular são separados por diálise com base no tamanho. **(A)** Coloca-se uma solução proteica contendo sais em um tubo de diálise, que é transferido para um béquer, sendo então dialisada, sob agitação magnética, contra um tampão apropriado. **(B)** A proteína é retida dentro do tubo de diálise, enquanto os sais serão trocados através da membrana. Utilizando grande volume de tampão externo, com substituição ocasional do tampão, a solução proteica será finalmente trocada pela solução de tampão externo.

A ultrafiltração substituiu em grande parte a diálise nos procedimentos de purificação das proteínas. Essa técnica utiliza a pressão para forçar a passagem da solução através de uma membrana semipermeável de tamanho de poro homogêneo e definido. Selecionando-se um filtro com valor de *cut-off* de peso molecular apropriado (tamanho do poro), as membranas tornarão possível que o solvente e os solutos de baixo peso molecular permeiem a membrana, formando um filtrado, enquanto permanecerão proteínas de peso molecular mais elevado na solução retida. A ultrafiltração pode ser utilizada para concentrar soluções proteicas ou para realizar a diálise com uma substituição contínua do tampão presente no compartimento de retenção.

Filtração em gel (peneiramento molecular)

A cromatografia por filtração em gel separa as proteínas com base no tamanho

A cromatografia por filtração em gel, ou por permeação em gel, utiliza uma coluna de polímeros insolúveis, mas altamente hidratados, como as dextranas, a agarose ou a poliacrilamida. A cromatografia por filtração em gel depende da migração diferencial dos solutos dissolvidos por meio dos géis que têm poros de tamanhos definidos. Essa técnica é utilizada frequentemente para a purificação de proteínas e na dessalinização de soluções proteicas. A Figura 2.12 descreve o princípio da filtração em gel. Há, no mercado, géis feitos com esferas de polímeros de carboidratos denominados dextranas (série Sephadex®), poliacrilamida (série Bio-Gel P®) e agarose (série Sepharose®), respectivamente. Os géis variam quanto ao tamanho do poro, e pode-se escolher o material para filtração em gel de acordo com o intervalo de fracionamento de peso molecular desejado.

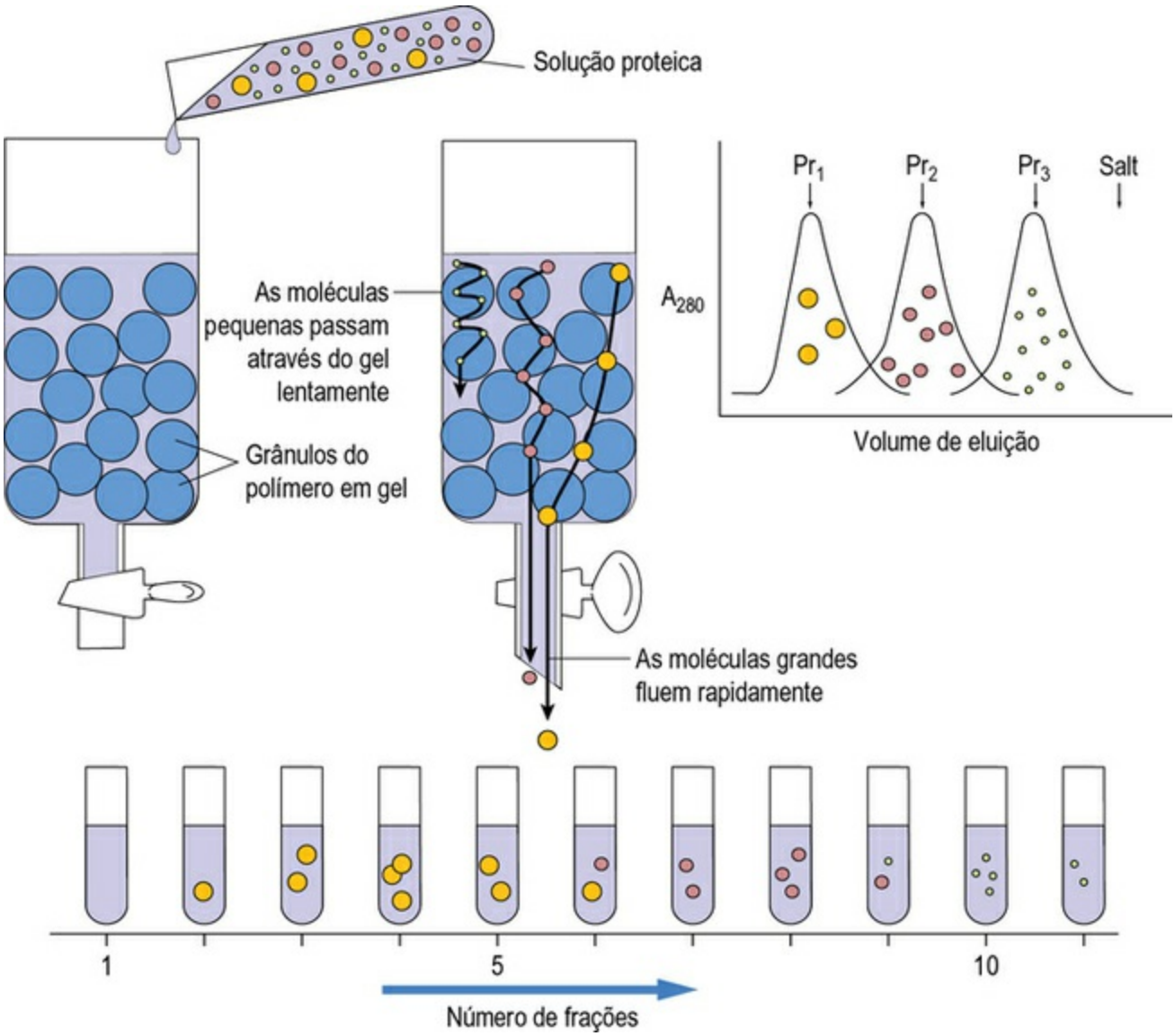


FIG. 2.12 Fracionamento de proteínas com base no tamanho: cromatografia de proteínas por filtração em gel. Proteínas com tamanhos moleculares diferentes são separadas por meio da filtração em gel com base no tamanho relativo. Quanto menor a proteína, mais facilmente ela é retida pelas esferas de polímero, enquanto as proteínas maiores podem ser completamente excluídas. As moléculas maiores fluem mais rapidamente por essa coluna, levando ao fracionamento com base no tamanho das moléculas. O cromatograma à direita na figura mostra o fracionamento teórico de três proteínas, Pr_1–Pr_3, de peso molecular decrescente.

Cromatografia por troca iônica

As proteínas ligam-se a matrizes de troca iônica com base em interações eletrostáticas

Quando um íon ou uma molécula com uma ou mais cargas positivas é trocado por outro componente carregado positivamente e ligado a uma fase imobilizada carregada negativamente, o processo é denominado troca catiônica. O processo inverso é chamado de troca aniônica. O trocador de cátions, a carboximetilcelulose ($O–CH_2–COO^-$), e o trocador de ânions, a dietilaminoetil (DEAE) celulose [$–O–C_2H_4–NH^+(C_2H_5)_2$], são utilizados frequentemente para a purificação de proteínas. Suponha a purificação de uma mistura proteica que contém albumina e imunoglobulina. Em pH 7,5, a albumina, que

tem um pI de 4,8, está com carga negativa; a imunoglobulina, que tem um pI ~ 8, apresenta carga positiva. Se a mistura for aplicada em uma coluna com DEAE celulose, equilibrada em pH 7,0, a albumina aderirá às cargas positivas da coluna, enquanto a imunoglobulina passará através dela. A Figura 2.13 ilustra o princípio da cromatografia por troca iônica. Como na cromatografia por permeação em gel, as proteínas podem ser separadas umas das outras com base nas pequenas diferenças entre seus valores de pI. **As proteínas adsorvidas são comumente eluídas utilizando-se um gradiente formado por duas ou mais soluções com diferentes valores de pH e/ou concentração salina**. Dessa maneira, as proteínas são gradativamente eluídas da coluna e são bem resolvidas com base em seus valores de pI.

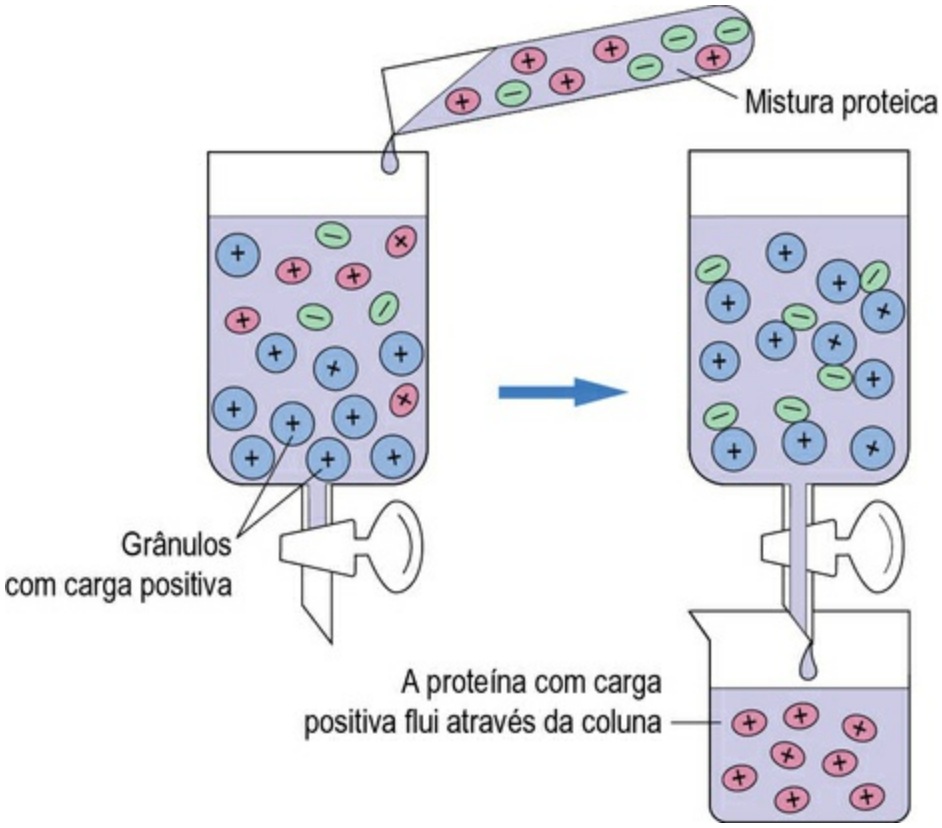


FIG. 2.13 Fracionamento de proteínas com base na carga elétrica: cromatografia por troca iônica. As misturas de proteínas podem ser separadas por meio da cromatografia por troca iônica de acordo com suas cargas líquidas. Os grânulos que apresentam grupos com carga positiva fixados são denominados trocadores de ânions, enquanto aqueles dotados de carga negativa são trocadores de cátions. A figura representa uma coluna trocadora de ânions. A proteína com carga negativa liga-se aos grânulos com carga positiva, e a proteína com carga positiva flui através da coluna.

Cromatografia por afinidade

A cromatografia por afinidade purifica proteínas com base em interações de ligantes

A cromatografia por afinidade é um método prático e específico para a purificação de proteínas. A matriz porosa da coluna de cromatografia é derivatizada com um ligante que interage, ou se liga, a uma proteína específica de uma mistura complexa. A proteína de

interesse será ligada seletiva e especificamente ao ligante, enquanto as outras fluem através da coluna. A proteína ligada pode, então, ser eluída da coluna por meio de alta concentração salina, desnaturação leve ou com uma forma solúvel do ligante ou de análogos do ligante (Cap. 6).

Determinação da pureza e do peso molecular de proteínas

A eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio pode ser usada para separar proteínas com base na carga

A eletroforese pode ser utilizada na separação de uma série de moléculas carregadas, como aminoácidos, polipeptídios, proteínas e DNA. Quando uma corrente é aplicada às moléculas em tampões diluídos, aquelas com carga líquida negativa no pH selecionado migram em direção ao anodo e aquelas com carga líquida positiva migram para o catodo. Geralmente utiliza-se um suporte poroso, como papel, acetato de celulose ou gel polimérico, para minimizar a difusão e a convecção.

Como na cromatografia, a eletroforese pode ser utilizada para o fracionamento preparativo de proteínas em pH fisiológico. Proteínas solúveis diferentes movem-se com velocidades diferentes no campo elétrico, dependendo da relação carga/massa de cada proteína. Um detergente desnaturante, o dodecil sulfato de sódio (SDS), é geralmente utilizado no sistema de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) para separar e diferenciar subunidades proteicas de acordo com o peso molecular. A amostra proteica costuma ser tratada com SDS e com um reagente tiólico, como o β-mercaptoetanol, para reduzir as pontes dissulfeto. Como a ligação do SDS é proporcional ao comprimento da cadeia peptídica, cada molécula proteica tem a mesma relação massa/carga, e a mobilidade relativa da proteína é proporcional à massa molecular da cadeia polipeptídica. A variação do estado das ligações cruzadas do gel de poliacrilamida confere seletividade para proteínas com pesos moleculares diferentes. Uma amostra proteica purificada pode ser facilmente analisada quanto à homogeneidade pelo método da SDS-PAGE com o uso de corantes sensíveis e específicos, como o azul de Coomassie, ou com a técnica de coloração por prata, conforme mostrado na Figura 2.14.

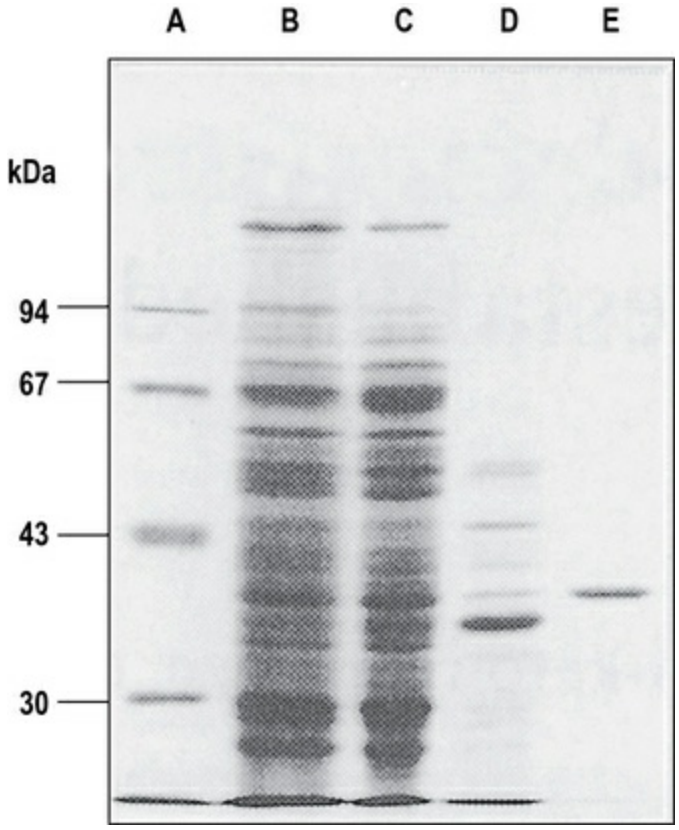


FIG. 2.14 SDS-PAGE. A eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio é utilizada para separar proteínas com base nos seus pesos moleculares. As moléculas maiores sofrem um retardo na matriz gelatinosa, enquanto as moléculas menores se movem mais rapidamente. A fileira A contém proteínas-padrão com massas moleculares conhecidas (indicadas em kDa à esquerda na figura). As fileiras B, C, D e E mostram os resultados da análise por SDS-PAGE de uma proteína nos vários estágios da purificação. B = proteína total isolada; C = precipitado com sulfato de amônio; D = fração da cromatografia por permeação em gel; E = proteína purificada a partir de cromatografia por troca iônica.

Focalização isoelétrica (IEF)

A focalização isoelétrica separa proteínas com base em seu ponto isoelétrico

A focalização isoelétrica (IEF) é conduzida em um microcanal ou gel contendo um gradiente de pH estabilizado. A proteína aplicada no sistema estará positiva ou negativamente carregada, dependendo de sua composição em aminoácidos e do pH do meio. Com a aplicação de uma corrente, a proteína se moverá em direção ao anodo ou catodo até encontrar a parte do sistema que corresponde ao seu pI, onde a proteína não tem carga e irá parar de migrar. **A IEF é utilizada em conjunto com a SDS-PAGE na eletroforese bidimensional em gel** (Fig. 2.15). Essa técnica é particularmente útil para o fracionamento de misturas proteicas complexas na realização da análise proteômica.

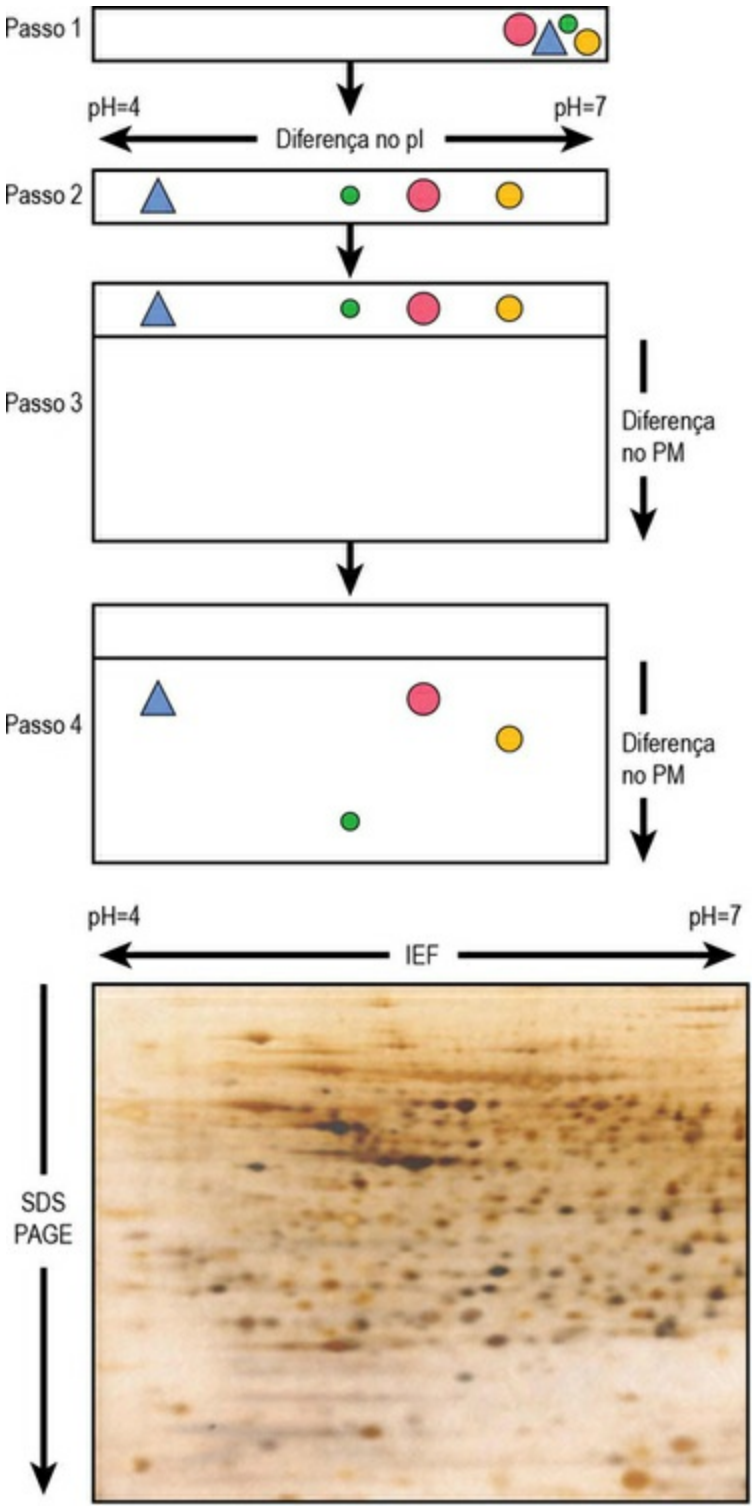


FIG. 2.15 Eletroforese bidimensional em gel. *(Acima)* **Passo 1:** Uma amostra contendo proteínas é aplicada em um gel cilíndrico de focalização isoelétrica, ao longo do gradiente de pH. **Passo 2:** Cada proteína migra para uma posição no gel correspondente ao seu ponto isoelétrico (pI). **Passo 3:** O gel de IEF é colocado horizontalmente no topo de um gel de SDS-PAGE. **Passo 4:** As proteínas são separadas por SDS-PAGE de acordo com seu peso molecular. *(Abaixo)* Exemplo típico de 2D-PAGE. Um fígado de rato homogeneizado foi fracionado por 2D-PAGE e as proteínas foram detectadas por meio de coloração com prata.

Quadro de conceitos avançados

Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A HPLC é uma técnica cromatográfica poderosa para a separação de proteínas,

peptídios e aminoácidos com alta resolução. O princípio da separação pode se basear na carga, no tamanho ou na hidrofobia das proteínas. As colunas estreitas são preenchidas com uma matriz não compressível composta por grânulos pequenos de sílica revestidos com uma camada delgada da fase estacionária. Uma mistura proteica é aplicada na coluna e, em seguida, os componentes são eluídos por eluição isocrática ou por meio de gradiente. Os eluatos são monitorados por meio de absorção da radiação ultravioleta, índice de refração ou fluorescência. Essa técnica possibilita uma separação com alta resolução.

Análise da estrutura das proteínas

A Figura 2.16 mostra um resumo das etapas características da purificação de uma proteína. Uma vez purificada para a determinação da composição de seus aminoácidos, a proteína é submetida à hidrólise, geralmente pela ação do HCl na concentração de 6 mol/L a 110°C, dentro de um tubo lacrado e submetido a vácuo, por um período de 24 a 48 h. Sob essas condições, o triptofano, a cisteína e a maioria da cistina são destruídos, e a glutamina e a asparagina são desaminadas quantitativamente para formar glutamato e aspartato, respectivamente. A recuperação da serina e da treonina é incompleta e diminui conforme aumenta o tempo de hidrólise.



FIG. 2.16 Estratégia para a purificação de proteínas. A purificação de uma proteína envolve uma sequência de etapas nas quais as proteínas contaminantes são removidas com base na diferença de tamanho, carga elétrica e hidrofobia. A purificação é monitorada pela SDS-PAGE (Fig. 2.14). A sequência primária da proteína pode ser determinada pela degradação de Edman automatizada sobre os peptídios (Fig. 2.18). A estrutura tridimensional da proteína pode ser determinada pela cristalografia por raios X.

Processos hidrolíticos alternativos podem ser utilizados para quantificar o triptofano, enquanto a cisteína e a cistina podem ser convertidas a um ácido cisteico estável em meio ácido antes da hidrólise. Após a hidrólise, os aminoácidos livres são separados por um analisador automatizado de aminoácidos utilizando uma coluna de troca iônica ou, após derivatização em pré-coluna com reagentes coloridos ou fluorescentes, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) por fase reversa. Os aminoácidos livres fracionados por cromatografia por troca iônica são detectados por meio de reação com um reagente cromogênico ou fluorogênico, como a ninidrina, o cloreto de dansila, o reagente de Edman (ver a seguir) ou o *o*-ftalaldeído. Essas técnicas possibilitam a determinação de quantidades tão pequenas quanto 1 pmol de cada aminoácido. A Figura 2.17 mostra o padrão de eluição típico dos aminoácidos de uma proteína purificada.

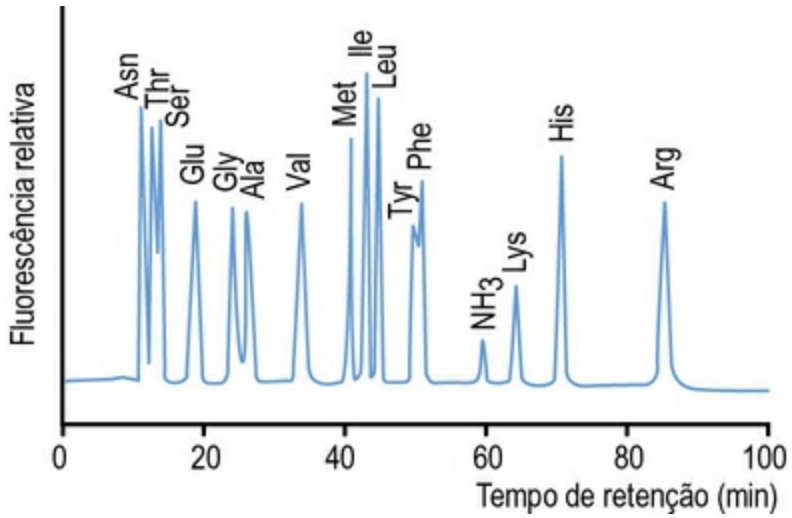


FIG. 2.17 Cromatograma obtido a partir de uma análise de aminoácidos realizada por cromatografia por troca catiônica. Um hidrolisado proteico é aplicado em uma coluna trocadora de cátions equilibrada com um tampão diluído em pH ácido (~3,0), no qual todos os aminoácidos estão carregados positivamente. Em seguida, os aminoácidos são eluídos por um gradiente crescente de pH e concentração salina. Os aminoácidos mais aniônicos (ácidos) eluem primeiro, seguidos pelos aminoácidos neutros e básicos. Os aminoácidos são derivatizados por meio de reação pós-coluna com um composto fluorogênico, como o *o*-ftalaldeído.

Quadro de conceitos avançados

O proteoma

O proteoma é definido como o conjunto completo de proteínas produzidas por um genoma em particular. Ocorrem modificações dos proteomas celulares e dos tecidos em resposta a sinalizações hormonais durante o crescimento e devido a estresses ambientais. A proteômica é definida como a comparação qualitativa e quantitativa de proteomas sob diferentes condições. Em uma abordagem para analisar o proteoma de uma célula, as proteínas são extraídas e submetidas à eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE). Cada *spot* proteico selecionado é identificado por coloração, e as proteínas são então extraídas e digeridas com proteases. Os pequenos peptídios retirados desse gel são sequenciados por meio da espectrometria de massas, o que possibilita a identificação da proteína. A Figura 2.15 mostra uma análise típica de um extrato de fígado de rato. Na eletroforese de fluorescência diferencial em gel bidimensional (DIGE), dois proteomas podem ser comparados por meio da marcação de suas proteínas com corantes fluorescentes diferentes, como vermelho e verde. As proteínas marcadas são misturadas e, a seguir, fracionadas por 2D-PAGE. As proteínas presentes em ambos os proteomas aparecerão como *spots* amarelos, enquanto as proteínas particulares a cada proteoma estarão vermelhas ou verdes (Cap. 36).

Determinação da estrutura primária das proteínas

Historicamente, a análise da sequência proteica era efetuada por meio de métodos químicos; atualmente, tanto a análise da sequência quanto a identificação

das proteínas são realizadas por espectrometria de massas

As informações sobre a sequência primária de uma proteína são essenciais para a compreensão de suas propriedades funcionais, para a identificação da família à qual a proteína pertence, assim como para a caracterização de proteínas mutadas que causam doenças. Uma proteína pode ser clivada primeiramente pela digestão por endoproteases específicas, como a tripsina (Cap. 6), a protease V8 ou a lisil endopeptidase, para a obtenção de fragmentos peptídicos. A tripsina cliva as ligações peptídicas na extremidade *C*-terminal dos resíduos da arginina e da lisina, contanto que o resíduo seguinte não seja a prolina. A lisil endopeptidase também é utilizada com frequência para clivar a extremidade *C*-terminal de lisina. A clivagem por reagentes químicos como o brometo de cianogênio também é útil. O brometo de cianogênio cliva a extremidade *C*-terminal dos resíduos de metionina. Antes da clivagem, as proteínas contendo resíduos de cisteína e cistina são reduzidas pelo 2-mercaptoetanol e, em seguida, são tratadas com iodoacetato para formar resíduos de carboximetilcisteína. Isso evita a formação espontânea de pontes dissulfeto inter- ou intramoleculares durante as análises.

Os peptídios clivados são submetidos, em seguida, à HPLC por fase reversa para a purificação dos fragmentos peptídicos e depois são sequenciados por um sequenciador de proteínas automatizado, utilizando a técnica de **degradação de Edman** (Fig. 2.18). A sequência dos peptídios sobrepostos é, então, utilizada para obter a estrutura primária da proteína. A técnica de degradação de Edman tem interesse, basicamente, histórico. A espectrometria de massas costuma ser mais empregada atualmente para a obtenção simultânea da massa molecular e da sequência dos polipeptídios (Cap. 36). Ambas as técnicas podem ser aplicadas diretamente às proteínas ou aos peptídios recuperados da SDS-PAGE ou da eletroforese bidimensional em gel (IEF + SDS-PAGE).

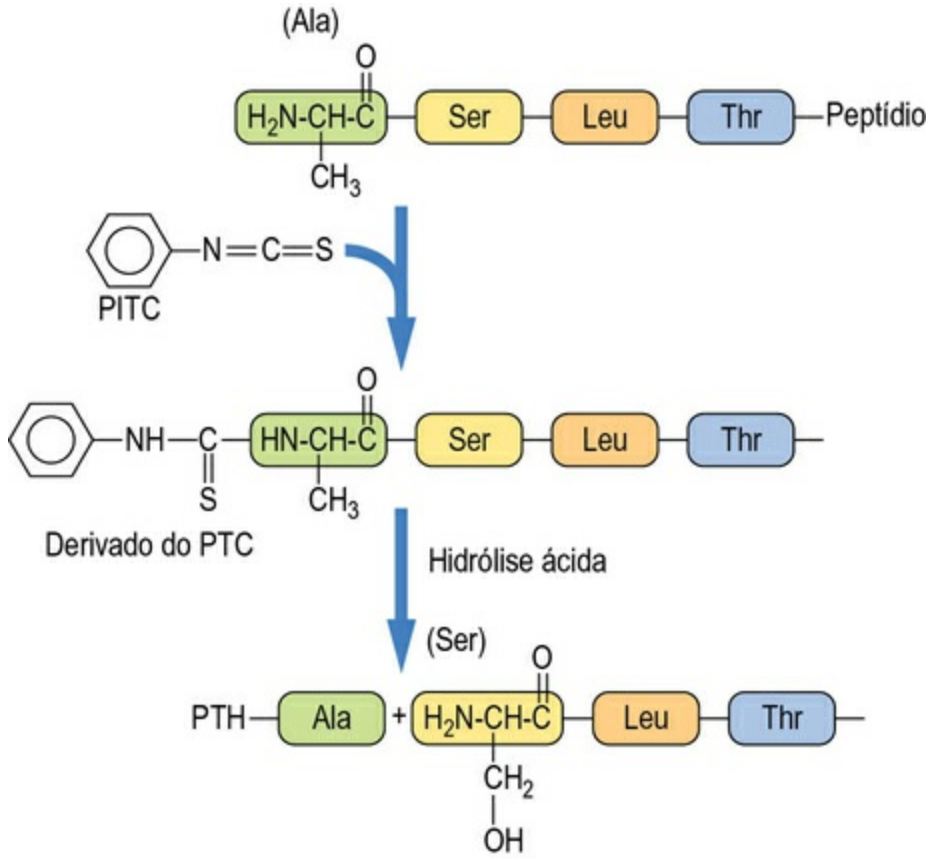


FIG. 2.18 Etapas da degradação de Edman. O método da degradação de Edman remove sequencialmente um resíduo de cada vez da extremidade aminoterminal de um peptídio. Em solução alcalina, o isotiocianato de fenila (PITC) converte o grupo amino *N*-terminal do peptídio imobilizado em um derivado feniltiocarbamil (PTC-aminoácido). O tratamento ácido remove o primeiro aminoácido na forma de um derivado da feniltio-hidantoína (PTH), que é identificado por HPLC.

A identificação e o sequenciamento da proteína também podem ser realizados empregando espectrometria de massas em *tandem* com fonte de ionização *eletrospray* (HPLC-ESI-MS/MS) (Cap. 36). Esta técnica é suficientemente sensível para que as proteínas separadas por 2D-PAGE (Fig. 2.15) possam ser recuperadas do gel para análise. Quantidades tão baixas quanto 1 μg de proteína por mancha podem ser digeridas com tripsina *in situ* e, em seguida, extraídas do gel e identificadas com base em sua sequência de aminoácidos. Tanto essa técnica quanto uma técnica complementar denominada espectrometria de massas por tempo de voo com ionização de matriz assistida por *laser* (MALDI-TOF) MS/MS (Cap. 36) podem ser empregadas para a determinação do peso molecular de proteínas intactas, como para a análise da sequência de peptídios, levando à identificação inequívoca da proteína.

Determinação da estrutura tridimensional das proteínas

A cristalografia por raios X e a espectroscopia por RMN costumam ser empregadas na determinação da estrutura tridimensional das proteínas

A cristalografia por raios X consiste na difração dos raios X pelos elétrons dos átomos que constituem a molécula. Contudo, como a difração dos raios X causada por uma única molécula é fraca, a proteína precisa estar na forma de um cristal bem organizado, no qual

cada molécula apresenta a mesma conformação em posição específica e orientação no interior da malha tridimensional. Com base na difração de um feixe colimado de elétrons, a distribuição da densidade eletrônica e a localização dos átomos do cristal podem ser calculadas para determinar a estrutura da proteína. Para a cristalização da proteína, a técnica utilizada com mais frequência é o método da gota suspensa, que utiliza um aparelho simples, o qual possibilita que uma pequena quantidade de uma solução proteica (geralmente uma gotícula de 10 μL contendo 0,5 a 1 mg/proteína) evapore gradualmente até alcançar o ponto de saturação no qual a proteína começa a cristalizar. A espectroscopia por RMN costuma ser empregada para a análise estrutural de pequenos compostos orgânicos, mas a RMN de alto campo também é útil para a determinação da estrutura de uma proteína em solução e complementa as informações obtidas pela cristalografia por raios X.



Quadro de conceitos avançados

Dobramento de proteínas

Para que as proteínas funcionem adequadamente, elas precisam se dobrar de modo correto. As proteínas evoluíram de tal maneira que um dobramento — o do estado nativo — é mais favorável que todos os outros. Várias proteínas auxiliam outras no processo de dobramento. Essas proteínas, denominadas **chaperonas**, contemplam as do "choque térmico", a HSP 60 e a HSP 70, e a proteína dissulfeto isomerase. A doença relacionada ao dobramento das proteínas é uma doença que está associada à conformação anormal de uma proteína. Essa modificação da conformação proteica ocorre em doenças crônicas relacionadas com a idade, como a doença de Alzheimer, a esclerose lateral amiotrófica e a doença de Parkinson.



Quadro clínico

Doença de creutzfeldt-jacob

Um homem de 56 anos, criador de gado, apresentava espasmos epilépticos e demência, e recebeu o diagnóstico de doença de Creutzfeldt-Jacob, uma doença humana causada por príons. As **doenças causadas por príons**, também conhecidas como encefalopatias espongiformes transmissíveis, são doenças neurodegenerativas que afetam tanto humanos quanto animais. Quando a doença acomete ovinos e caprinos, é denominada *scrapie* ("tremedeira de carneiros") e, quando atinge vacas, chama-se encefalopatia espongiforme bovina (doença da vaca louca). Essas doenças caracterizam-se pelo acúmulo de uma isoforma anormal da proteína codificada pelo hospedeiro, a forma celular da proteína priônica (PrPC), nos cérebros afetados.

Comentário

Os príons parecem ser compostos apenas por moléculas de PrPSc (forma *scrapie* da

PrPC), que são confôrmeros anormais da proteína normal, codificada pelo hospedeiro. A PrPC apresenta grande quantidade de α-hélices e é desprovida de folhas pregueadas β, enquanto a PrPSc tem uma quantidade elevada de folhas pregueadas β. A conversão da PrPC em PrPSc envolve uma profunda mudança conformacional. A progressão das doenças infecciosas causadas por príons parece envolver uma interação entre a PrPC e a PrPSc, que induz uma mudança conformacional da PrPC rica em α-hélices para o confôrmero rico em folhas pregueadas β da PrPSc. A doença causada por príons derivados da PrPSc pode ser de origem genética ou infecciosa. As sequências dos aminoácidos das diferentes PrPCs dos mamíferos são semelhantes, e a conformação da proteína é praticamente a mesma em todas as espécies de mamíferos.

Resumo

- Vinte alfa-aminoácidos são os elementos constituintes das proteínas. As cadeias laterais desses aminoácidos contribuem com carga, polaridade e hidrofobicidade para a proteína.
- As proteínas são macromoléculas formadas por polimerização de L-α-aminoácidos por meio de ligações peptídicas. A sequência linear dos aminoácidos constitui a estrutura primária da proteína.
- A estrutura e a conformação de uma proteína é o produto de suas estruturas secundária, terciária e quaternária.
- Estas estruturas de ordem mais elevada são formadas por pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas, pontes salinas e ligações covalentes entre as cadeias laterais dos aminoácidos.
- A purificação e a caracterização das proteínas são essenciais à elucidação de sua estrutura e sua função. Tirando partido das diferenças no tamanho, na solubilidade, na carga e nas propriedades de ligação com ligantes, as proteínas podem ser purificadas até a homogeneidade empregando-se várias técnicas cromatográficas e eletroforéticas. A massa molecular e a pureza de uma proteína e sua composição em subunidades podem ser determinadas por SDS-PAGE.
- A decifração das estruturas primária e tridimensional de uma proteína por métodos químicos, espectrometria de massas, análise por raios X e espectroscopia de RMN leva à compreensão de relações entre estrutura e função nas proteínas.

Questões para aprendizagem

1. A análise do sangue, da urina e dos tecidos por espectrometria de massas está sendo utilizada atualmente no diagnóstico clínico. Discuta os méritos dessa técnica com respeito à especificidade, à sensibilidade, ao rendimento e à amplitude da análise, inclusive a análise proteômica com fins diagnósticos.
2. Revise a importância do dobramento incorreto das proteínas e sua deposição nos tecidos nas doenças crônicas relacionadas à idade.

Leituras sugeridas

Aguzzi, A., Falsig, J. Prion propagation, toxicity and degradation. *Nat Neurosci*. 2012; 15:936–939.

Dominguez, D. C., Lopes, R., Torres, M. L. Proteomics: clinical applications. *Clin Lab Sci*. 2007; 20:245–248.

Griffin, M. D., Gerrard, J. A. The relationship between oligomeric state and protein function. *Adv Exp Med Biol*. 2012; 747:74–90.

Kovacs, G. G., Budka, H. Prion diseases: from protein to cell pathology. *Am J Pathol*. 2008; 172:555–565.

Marouga, R., David, S., Hawkins, E. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal Bioanal Chem*. 2005; 382:669–678.

Matt, P., Fu, Z., Ru, Q., Van Eyk, J. E. Biomarker discovery: proteome fractionation and separation in biological samples. *J Physiol Genomics*. 2008; 14:12–17.

Shkundina, I. S., Ter-Avanesyan, M. D. Prions. *Biochemistry (Moscow)*. 2007; 72:1519–1536.

Sułkowska, J. I., Rawdon, E. J., Millett, K. C., et al. Conservation of complex knotting and slipknotting patterns in proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109:E1715–1723.

Walsh, C. T. *Posttranslational modification of proteins: expanding nature's inventory*, ed 3. Colorado: Roberts & Co; 2007.

Sites

Protein Data Bank: www.rcsb.org – Use Search Box, then select a structure and view protein in Jmol.

www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure – National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine. Several databases, including protein structure.

http://us.expasy.org – Bioinformatics resource portal.

CAPÍTULO 3

Carboidratos e Lipídios

John W. Baynes

Objetivos

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever a estrutura e a nomenclatura dos carboidratos.
- Identificar os principais carboidratos do corpo humano e de nossa dieta.
- Distinguir açúcares redutores dos não redutores.
- Descrever os vários tipos de ligações glicosídicas nos oligossacarídios e nos polissacarídios.
- Identificar as principais classes de lipídios do corpo humano e na dieta.
- Descrever os tipos de ligações nos lipídios e sua sensibilidade à saponificação.
- Explicar o papel principal dos triglicerídios, fosfolipídios e glicolipídios no organismo.
- Explicar as características gerais do modelo do mosaico fluido da estrutura das membranas biológicas.

Introdução

Os carboidratos e os lipídios são as principais fontes de energia e encontram-se armazenados no corpo sob a forma de glicogênio e triglicerídios, respectivamente

Este capítulo descreve a estrutura dos carboidratos e dos lipídios encontrados na dieta e nos tecidos. Essas duas classes dos compostos distinguem-se significativamente em suas propriedades físicas e químicas. Os carboidratos são hidrofílicos; os carboidratos menores, como o açúcar do leite e o açúcar de mesa, são solúveis em solução aquosa, enquanto polímeros como o amido e a celulose formam dispersões coloidais ou são insolúveis. Os lipídios variam no tamanho, mas raramente excedem 2 kDa de massa molecular; são insolúveis na água, porém solúveis em solventes orgânicos. Tanto os carboidratos quanto os lipídios podem ligar-se às proteínas e desempenhar funções

estruturais e regulatórias importantes, as quais serão abordadas nos próximos capítulos. Este capítulo termina com uma descrição do **modelo do mosaico fluido** das membranas biológicas, ilustrando como as proteínas, os carboidratos e os lipídios são integrados na estrutura das membranas biológicas que circundam a célula e os compartimentos intracelulares.

Carboidratos

Nomenclatura e estrutura de açúcares simples

A definição clássica de um carboidrato é a de um aldeído ou uma cetona poli-hidroxilado

Os carboidratos mais simples, com dois grupamentos hidroxila, são o gliceraldeído e a di-hidroxiacetona (Fig. 3.1). Esses açúcares com três átomos de carbono são chamados de trioses; o sufixo "ose" designa "açúcar". O gliceraldeído é uma **aldose**, e a di-hidroxiacetona, uma **cetose**. Os prefixos e os exemplos de açúcares com cadeia mais longa são mostrados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1

Classificação dos carboidratos pelo comprimento da cadeia carbônica

Número de carbonos	Nome	Exemplos na biologia humana
Três	Triose	Gliceraldeído, di-hidroxiacetona
Quatro	Tetrose	Eritrose
Cinco	Pentose	Ribose, ribulose*, xilose, xilulose*, desoxirribose
Seis	Hexose	Glicose, manose, galactose, fucose, frutose
Sete	Heptose	Sedo-heptulose*
Oito	Octose	Nenhum
Nove	Nonose	Ácido neuramínico (siálico)

*A denominação "ul" indica que um açúcar é uma cetose; o nome formal para a frutose seria "gliculose". Da mesma maneira que a frutose, o grupo cetônico está localizado no C-2 do açúcar, e os carbonos restantes têm a mesma geometria que o açúcar de origem.

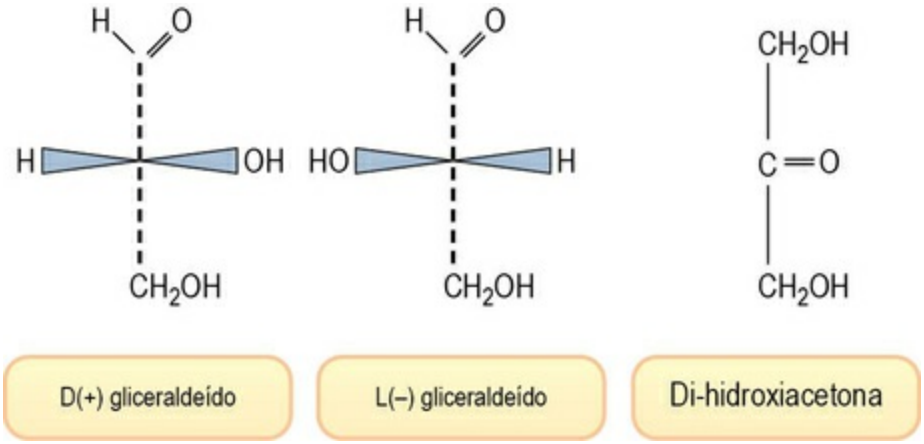


FIG. 3.1 Estrutura das trioses.
d e l-gliceraldeído (aldoses) e di-hidroxiacetona (uma cetose).

A numeração dos carbonos começa da extremidade que contém o grupo funcional aldeído ou cetona. Os açúcares são classificados nas famílias d ou l, tendo como base a configuração em torno do centro assimétrico com numeração mais elevada (Fig. 3.2). Ao contrário do observado para os l-aminoácidos, quase todos os açúcares encontrados no organismo estão na configuração d.

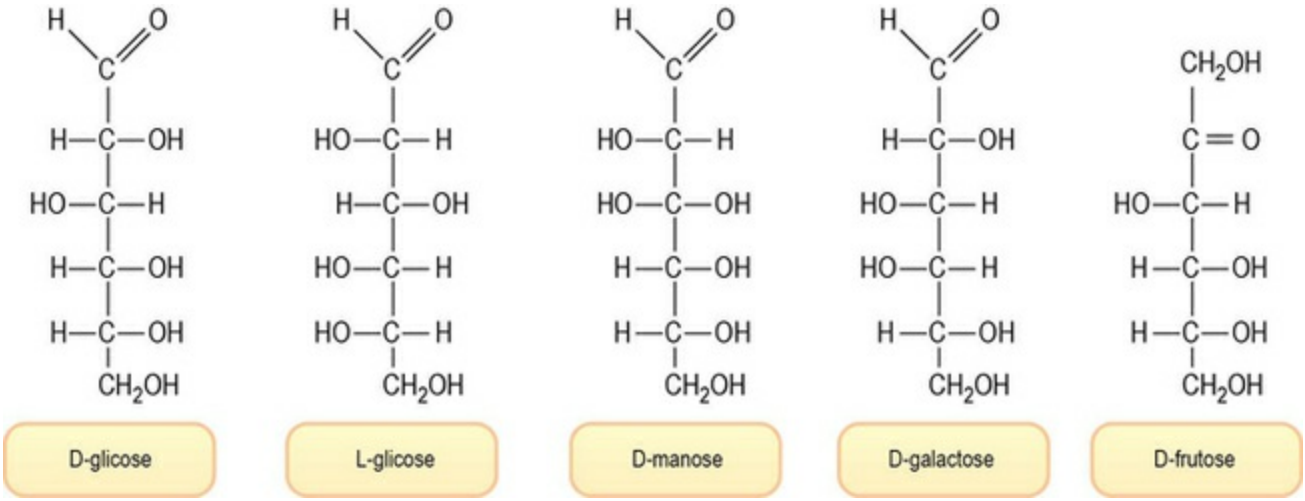


FIG. 3.2 Estrutura das hexoses: d e l-glicose, d-manose, d-galactose e d-frutose.
As designações d e l baseiam-se na configuração do centro assimétrico de maior numeração, o *C*-5 no caso das hexoses. Note que a l-glicose é a imagem especular da d-glicose, ou seja, a geometria em todos os carbonos assimétricos está invertida. A manose é epímera da glicose no *C*-2 e a galactose é epímera da glicose no *C*-4. Essas projeções lineares das estruturas dos carboidratos são conhecidas como projeções de Fischer.

Uma aldo-hexose, como a glicose, contém quatro centros de assimetria, de modo que há 16 (2^4) estereoisômeros possíveis, dependendo de cada um dos quatro carbonos estar na configuração d ou l (Fig. 3.2). Oito dessas aldo-hexoses são d-açúcares. Apenas três delas são encontradas em quantidades significativas no corpo: a glicose (açúcar do sangue), a manose e a galactose (Fig. 3.2). Do mesmo modo, há quatro epímeros possíveis das d-ceto-hexoses; a frutose (açúcar das frutas) (Fig. 3.2) é a única ceto-hexose presente em concentração significativa em nossa dieta ou no organismo.

Devido à presença de seus centros assimétricos, os açúcares são compostos

opticamente ativos. A rotação do plano da luz polarizada pode ser dextrorrotatória (+) ou levorrotatória (–). Geralmente, essa designação está também incluída no nome do açúcar; assim d(+)-glicose ou d(–)-frutose indica que a forma d da glicose é dextrorrotatória enquanto a forma d da frutose é levorrotatória.

Ciclização dos açúcares

As estruturas lineares dos açúcares mostradas na Figura 3.2 indicam que os açúcares classificados como aldoses têm um resíduo aldeído, quimicamente reativo, facilmente oxidável e eletrofílico. Os aldeídos como o formaldeído e o glutaraldeído reagem rapidamente com os grupos amino das proteínas para formar adutos de base de Schiff (imina) e ligações cruzadas durante a fixação dos tecidos. Entretanto, a glicose é relativamente resistente à oxidação e não reage rapidamente com proteínas. Conforme mostrado na Figura 3.3, em solução aquosa a pH 7,4 e a 37°C, a glicose encontra-se principalmente (99,99%) na sua conformação de hemiacetal cíclica, inerte e não reativa. De todos os d-açúcares existentes no mundo, a d-glicose ocorre em maior quantidade nessa conformação cíclica, o que a torna menos oxidável e menos reativa com proteínas. Propôs-se que a inércia química relativa da glicose é a razão para sua seleção evolutiva como o açúcar do sangue.

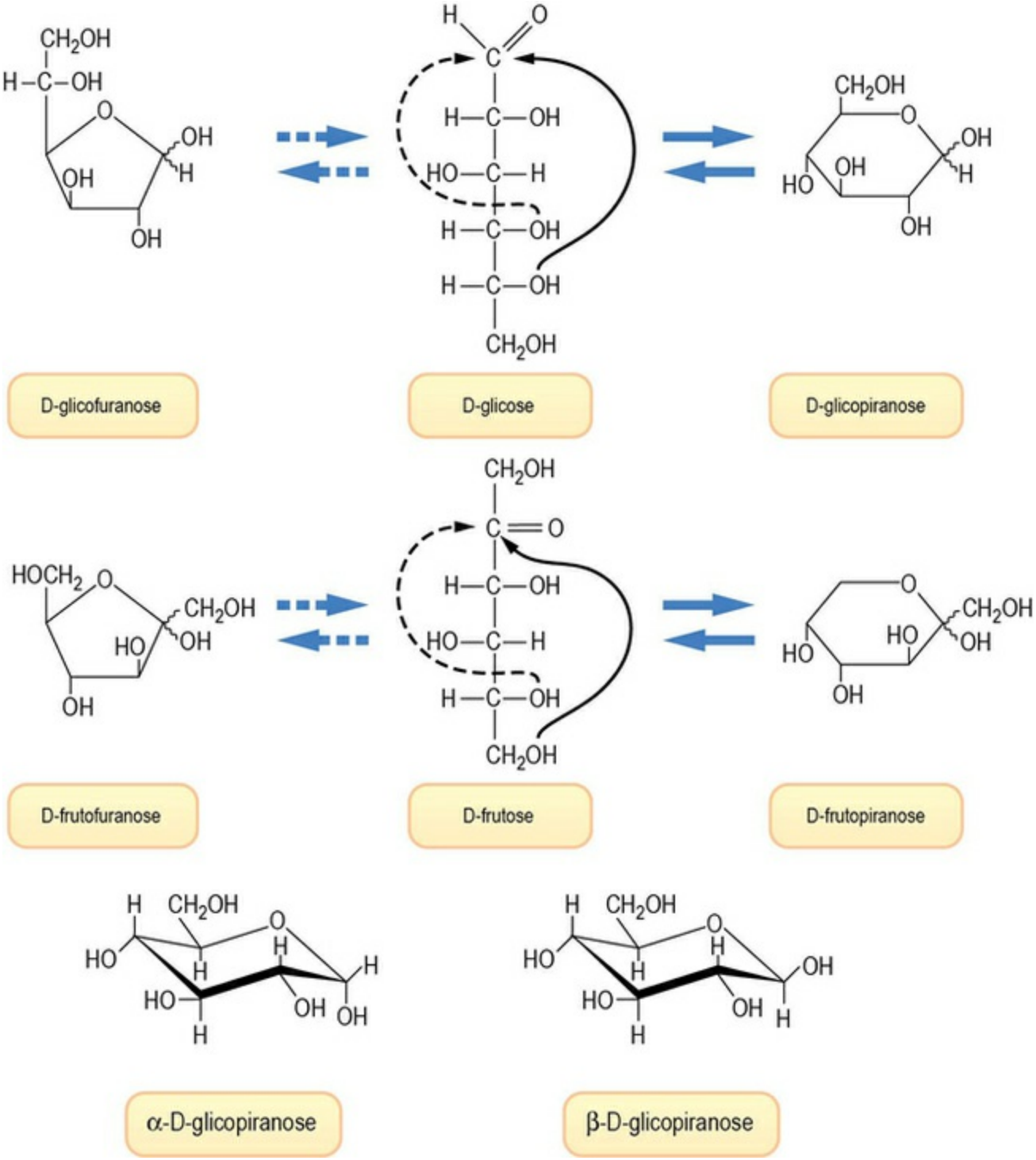


FIG. 3.3 Representação linear e cíclica da glicose e da frutose.
(Acima) Há quatro fórmulas cíclicas da glicose em equilíbrio com a fórmula linear: α e β-glicopiranose e α e β-glicofuranose. Mais de 99% da glicose total em solução está sob a forma de piranose. Essas conformações cíclicas são conhecidas como projeções de Haworth; por convenção, os grupos à direita nas projeções de Fischer são mostrados abaixo do anel, e os grupos à esquerda, acima do anel. As ligações contorcidas entre o H e a OH do *C*-1, o carbono anomérico, indicam uma geometria indeterminada e representam o anômero α ou β. (Ao centro) A forma linear e cíclica da frutose. A proporção piranose:furanose para a frutose em solução aquosa é de ~3:1. A relação varia em função da temperatura, do pH, da concentração salina e de outros fatores. (Abaixo) Representações estereoquímicas das formas em cadeira da α e β-glicopiranose. A estrutura preferencial em solução, a β-glicopiranose, tem todos os grupos hidroxila, inclusive o grupo hidroxila anomérico, em posições equatoriais em torno do anel, minimizando as interações estéricas.

Quando a glicose se cicliza a um hemiacetal, pode formar uma estrutura em anel denominada **furanose** ou **piranose**, nome dado pela semelhança com os ésteres cíclicos

de carbonos 5 e 6, furano e pirano (Fig. 3.3). Note que a reação de ciclização cria um centro assimétrico novo no *C*-l, chamado de **carbono anomérico**. A conformação preferencial da glicose é a de beta-anômero (~65%), em que o grupo hidroxila no *C*-l está orientado equatorialmente ao anel. O beta-anômero é a forma mais estável da glicose porque todos os grupos hidroxila, que são mais volumosos do que o hidrogênio, estão orientados equatorialmente, no plano do anel. Os anômeros alfa (α) e beta (β) da glicose podem ser isolados na forma pura pela cristalização seletiva a partir de solventes aquosos e orgânicos. Eles têm rotações ópticas diferentes, mas em solução aquosa as formas se convertem uma na outra durante um período de horas, até alcançar o equilíbrio, formando uma mistura com uma proporção de 65:35 dos anômeros β:α. Essas diferenças na estrutura podem não parecer importantes. No entanto, algumas vias metabólicas usam um anômero, mas não o outro, e vice-versa. De maneira semelhante, enquanto as conformações frutopiranosídicas constituem as formas principais da frutose em solução aquosa, a maior parte do metabolismo da frutose provém da forma furanosídica.

Além das estruturas básicas de açúcares já discutidas anteriormente, outras estruturas comuns de açúcares são apresentadas na Figura 3.4. Esses açúcares, desoxiaçúcares, aminoaçúcares e os açúcares ácidos são encontrados principalmente nas estruturas dos oligossacarídios ou polissacarídios presentes no corpo; por exemplo, a ribose do RNA e a desoxirribose do DNA podem estar unidos às proteínas ou aos lipídios para formar glicoconjugados (glicoproteínas ou glicolipídios, respectivamente). **A glicose é o único açúcar encontrado em um grau significativo como um açúcar livre (açúcar do sangue) no organismo**.

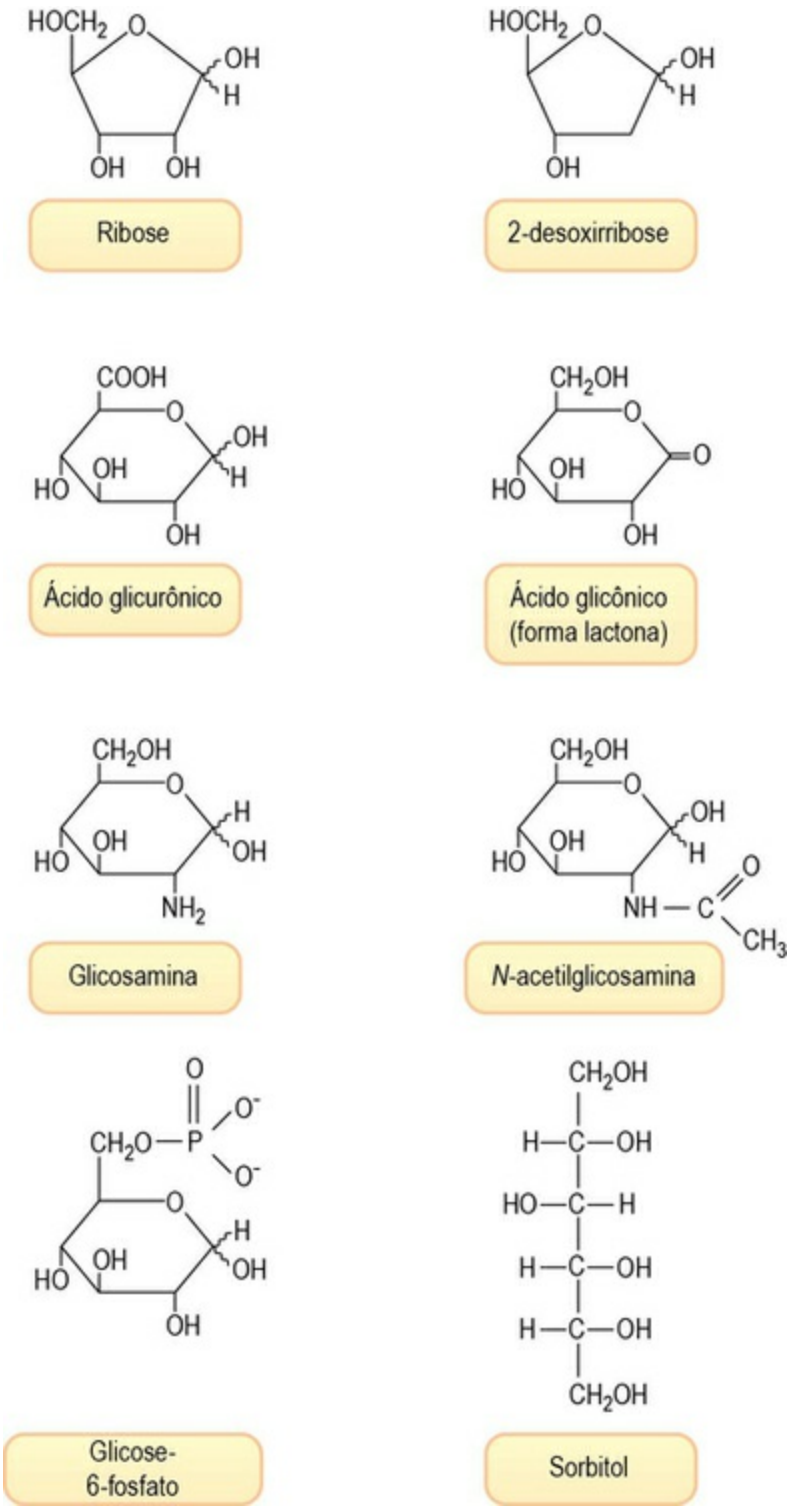


FIG. 3.4 Exemplos de vários tipos de açúcares encontrados nos tecidos humanos. Ribose, o açúcar pentose do ácido ribonucleico (RNA); 2-desoxirribose, a desoxipentose do DNA; ácido glicurônico, um açúcar ácido formado pela oxidação do *C*-6 da glicose; ácido glicônico, um açúcar ácido formado pela oxidação do *C*-1 da glicose, mostrado na forma de δ-lactona; glicosamina, um amino açúcar; *N*-acetilglicosamina, um amino açúcar acetilado; glicose-6-fosfato, um éster fosfato da glicose, um intermediário do metabolismo da glicose; sorbitol, um poliol formado pela redução da glicose.

Dissacarídios, oligossacarídios e polissacarídios

Os açúcares encontram-se ligados uns aos outros por ligações glicosídicas, formando glicanas complexas

Em geral, os carboidratos são acoplados um ao outro por meio de ligações glicosídicas para formar dissacarídios, trissacarídios, oligossacarídios e polissacarídios. Os sacarídios compostos de um único açúcar são denominados homoglicanas, enquanto os sacarídios com composição complexa são denominados heteroglicanas. O nome das estruturas mais complexas envolve não apenas o nome dos açúcares componentes, mas também a conformação do anel dos açúcares, a configuração anomérica da ligação entre os açúcares, o sítio de ligação de um açúcar ao outro e a natureza do átomo envolvido na ligação, geralmente um oxigênio ou ligação *O*-glicosídica, e às vezes um nitrogênio ou uma ligação *N*-glicosídica. A Figura 3.5 apresenta a estrutura de diversos dissacarídios comuns em nossa dieta: a **lactose** (açúcar do leite), a **sacarose** (açúcar de mesa), a **maltose** e a isomaltose, que são produtos da digestão do amido, a celobiose, que é obtida por hidrólise da celulose, e o **ácido hialurônico.**

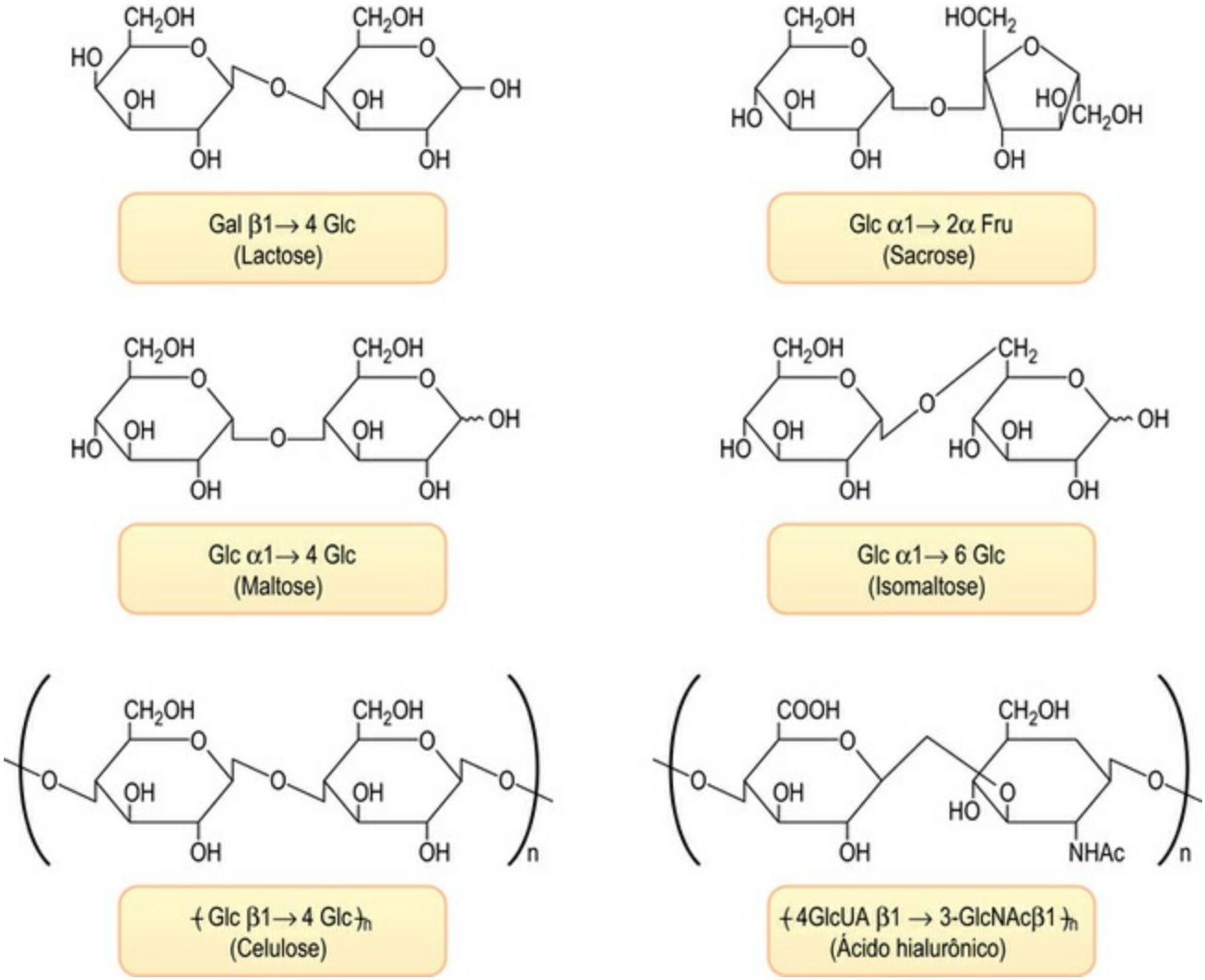


FIG. 3.5 Estruturas de dissacarídios e polissacarídios comuns.
Lactose (açúcar do leite); sacarose (açúcar de mesa); maltose e isomaltose, dissacarídios formados pela degradação do amido; e unidades dissacarídicas repetitivas da celulose (da madeira) e do ácido hialurônico (dos discos vertebrais). Fru, frutose; Gal, galactose; Glc, glicose; GlcNAc, *N*-acetilglicosamina; GlcUA, ácido glicurônico.

As diferenças na ligação de açúcares fazem uma grande diferença no metabolismo e

A amilose, um componente do **amido**, é uma glicana linear com ligações α-1→4, enquanto a **celulose** é uma glicana linear com ligações β-1→4. Esses dois polissacarídios diferem-se somente na ligação anomérica entre as subunidades de glicose, mas são moléculas bem distintas. O amido é solúvel na água, a celulose é insolúvel; o amido é pastoso, a celulose é fibrosa; o amido é digerível, enquanto a celulose não é digerida por seres humanos; o amido é um alimento rico em calorias, enquanto a celulose é uma fibra não digerível.



Quadro de conceitos avançados

A informação do conteúdo de glicanas complexas

Os açúcares são unidos entre si por meio de **ligações glicosídicas** entre um carbono do hemiacetal de um açúcar e um grupo hidroxila do outro açúcar. Dois resíduos de glicose podem estar unidos por meio de diferentes ligações (ou seja, α1,2; α1,3; α1,4; α1,6; β1,2; β1,3; β1,4; β1,6; α,α1,1; α,β1,1; β,β1,1), dando origem a 11 dissacarídios diferentes, cada um com propriedades biológicas e químicas diferentes. Dois açúcares diferentes, como a glicose e a galactose, podem estar ligados ou como glicose → galactose ou como galactose → glicose, e esses dois dissacarídios podem ter um total de 20 isômeros diferentes.

Por outro lado, dois aminoácidos idênticos, como duas alaninas, podem formar somente o dipeptídio alanil-alanina. Além disso, dois aminoácidos diferentes, como a alanina e a glicina, podem formar somente dois dipeptídios, alanil-glicina e glicil-alanina. Em consequência, os açúcares têm o potencial de fornecer bastante informação química. Conforme delineado nos Capítulos 27 a 29, os carboidratos ligados às proteínas e aos lipídios nas membranas celulares podem servir como sinais de reconhecimento para interações célula-célula e célula-patógeno.



Quadro de teste clínico

Teste de açúcar redutor para a glicose sanguínea

Os testes originais para a glicose sanguínea mediam a atividade redutora do sangue.

Esses testes funcionavam porque a glicose, na concentração 5 mM, é a principal substância redutora do sangue. Os testes de Fehling e de Benedict utilizam soluções alcalinas de sal cúprico. Com o aquecimento, a glicose decompõe-se oxidativamente, produzindo uma mistura complexa de ácidos orgânicos e de aldeídos. A oxidação do açúcar reduz o íon cúprico (azul-esverdeado) ao íon cuproso (laranja-avermelhado) na solução. A intensidade da cor produzida é diretamente proporcional ao conteúdo de glicose na amostra.

Os ensaios de açúcar redutor não distinguem a glicose de outros açúcares redutores, como a frutose ou a galactose. Nas doenças relativas ao metabolismo da frutose ou da

galactose, como a intolerância hereditária à frutose ou a galactosemia (Cap. 27), esses testes podem fornecer resultados positivos, criando a falsa impressão do diabetes.

Lipídios

Os lipídios estão localizados, principalmente, em três compartimentos no corpo: plasma, tecido adiposo e membranas biológicas

Esta parte irá se concentrar na estrutura dos ácidos graxos (a forma mais simples de lipídios, encontrada principalmente no plasma), dos **triglicerídios** (a forma de armazenamento dos lipídios, encontrada principalmente no tecido adiposo) e dos **fosfolipídios** (a classe principal dos lipídios das membranas em todas as células). Os esteroides, como o colesterol, e os (glico)esfingolipídios serão mencionados no contexto das membranas biológicas, mas esses lipídios e outros, como os eicosanoides, serão comentados detalhadamente em capítulos posteriores.

Ácidos graxos

Os ácidos graxos ocorrem na forma livre e como componentes de lipídios mais complexos

Conforme resumido na Tabela 3.2, são ácidos de alcanos de cadeias lineares longas, que contêm geralmente 16 ou 18 carbonos. Podem ser saturados ou insaturados – estes últimos contêm 1-5 duplas ligações, todos na geometria *cis*. As duplas ligações não são conjugadas, mas são separadas por grupos metileno.

Tabela 3.2

Estrutura e ponto de fusão de ácidos graxos de ocorrência natural

Átomos de carbono		Fórmula química	Nome sistemático	Nome comum	Ponto de fusão (°C)
Ácidos graxos saturados					
12	12:0	$CH_3(CH_2)_{10}COOH$	*n*-dodecanoico	Láurico	44
14	14:0	$CH_3(CH_2)_{12}COOH$	*n*-tetradecanoico	Mirístico	54
16	16:0	$CH_3(CH_2)_{14}COOH$	*n*-hexadecanoico	Palmítico	63
18	18:0	$CH_3(CH_2)_{16}COOH$	*n*-octadecanoico	Esteárico	70
20	20:0	$CH_3(CH_2)_{18}COOH$	*n*-eicosanoico	Araquídico	77
Ácidos graxos insaturados					
16	16:1; ω-6, Δ^9	$CH_3(CH_2)_5CH{=}CH(CH_2)_7COOH$		Palmitoleico	–0,5
18	18:1; ω-9, Δ^9	$CH_3(CH_2)_7CH{=}CH(CH_2)_7COOH$		Oleico	13
18	18:2; ω-6, $\Delta^{9,12}$	$CH_3(CH_2)_4CH{=}CHCH_2CH{=}CH(CH_2)_7COOH$		Linoleico	–5
18	18:3; ω-3, $\Delta^{9,12,15}$	$CH_3CH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CH(CH_2)_7COOH$		Linolenico	–11
20	20:4; ω-6, $\Delta^{5,8,11,14}$	$CH_3(CH_2)_4CH{=}CHCH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CHCH_2CH{=}CH(CH_2)_7COOH$		Araquidônico	–50

Para os ácidos graxos insaturados, a designação "ω" indica a localização da primeira dupla ligação a partir da extremidade metil da molécula; os Δ sobrescritos indicam a posição das duplas ligações a partir da extremidade carboxil da molécula. Os ácidos graxos insaturados respondem por, aproximadamente, dois terços de todos os ácidos graxos no corpo; o oleato e o palmitato respondem por cerca de metade e um quarto dos ácidos graxos totais no corpo.

Os ácidos graxos com uma única dupla ligação são denominados monoinsaturados, enquanto aqueles com duas ou mais duplas ligações são denominados ácidos graxos poli-insaturados. Os ácidos graxos poli-insaturados são classificados comumente em dois grupos, dos **ácidos graxos ω-3 e ω-6**, dependendo de a primeira dupla ligação aparecer a uma distância de três ou seis carbonos a partir do grupo metila terminal. O ponto de fusão dos ácidos graxos, assim como o de lipídios mais complexos, aumenta com o comprimento da cadeia do ácido graxo, porém diminui com o número de duplas ligações. As **duplas ligações *cis*** provocam uma torção na estrutura linear do ácido graxo, interferindo com o empacotamento justo. Consequentemente, isso requer uma temperatura mais baixa para congelar-se, ou seja, têm um ponto de fusão mais baixo.

Triacilgliceróis (triglicerídios)

Os triglicerídios são a forma de armazenamento dos lipídios no tecido adiposo

Os ácidos graxos nos tecidos animais e vegetais estão geralmente esterificados com o glicerol, formando um triacilglicerol (triglicerídio) (Fig. 3.6), como óleos (líquidos) ou gorduras (sólidas). Nos seres humanos, os triglicerídios são armazenados na forma sólida (gordura) no tecido adiposo. Eles são degradados a glicerol e ácidos graxos em

resposta aos sinais hormonais, e a seguir liberados no plasma para o metabolismo em outros tecidos, principalmente no músculo e no fígado. A ligação éster dos triglicerídios e de outros glicerolipídios é também prontamente hidrolisada *ex vivo* por uma base forte, como o NaOH, dando origem ao glicerol e aos ácidos graxos livres. Esse processo é conhecido como **saponificação**; um dos produtos, o sal sódico do ácido graxo, é o sabão.

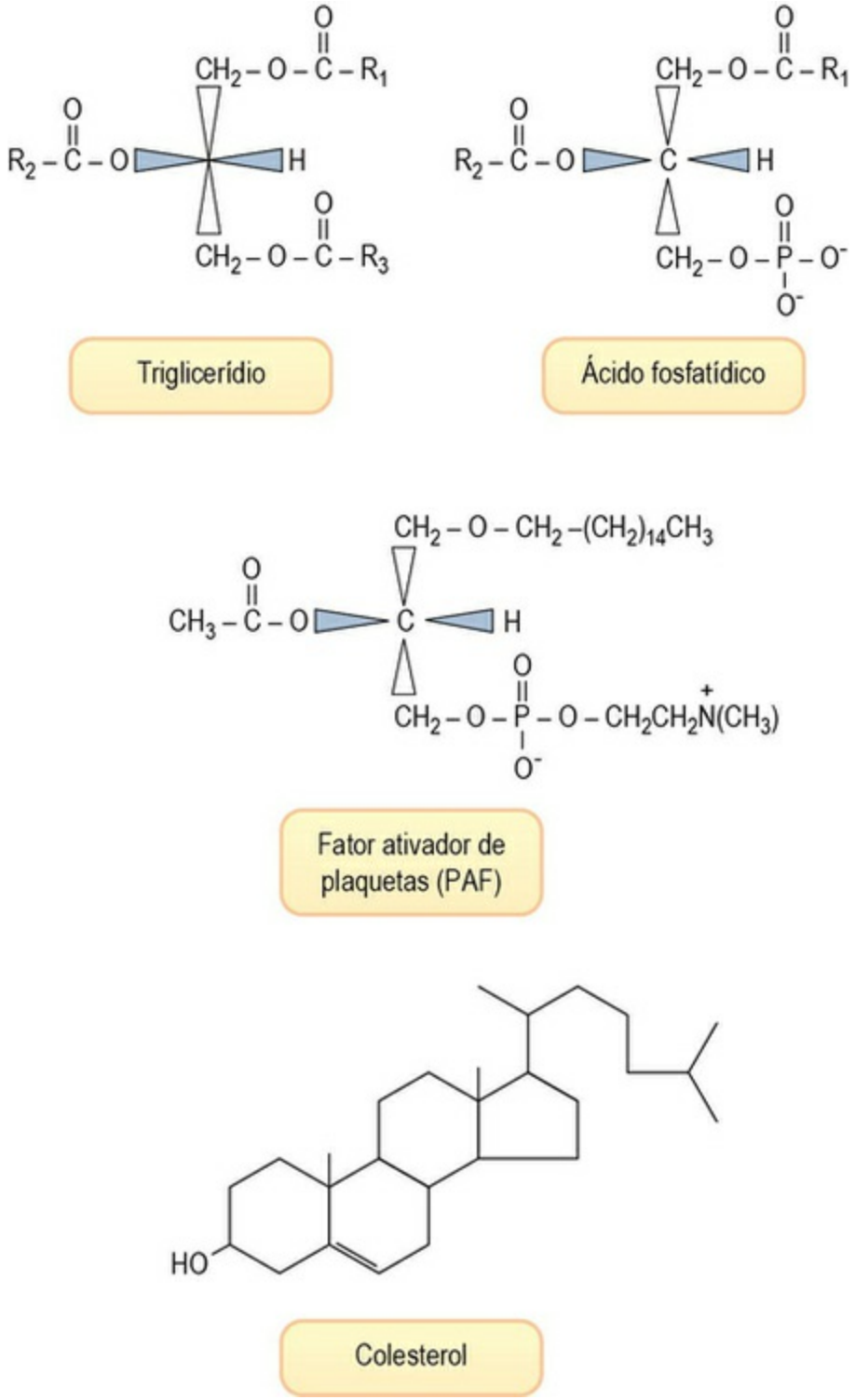


FIG. 3.6 Estrutura de quatro lipídios com funções biológicas significativamente diferentes. Os triglicerídios são as gorduras de armazenamento. O ácido fosfatídico é um precursor metabólico tanto de triglicerídios quanto de fosfolipídios (Fig. 3.7). O fator ativador de plaquetas, um mediador da inflamação, é um fosfolipídio incomum, com um álcool lipídico em vez de um lipídio esterificado na posição *sn*-l, um grupo acetil na posição *sn*-2 e uma fosfatidilcolina esterificada na posição *sn*-3. O colesterol é menos polar do que os fosfolipídios; o grupo hidroxila tende a estar na superfície da membrana, enquanto os sistemas policíclicos intercalam-se entre as cadeias do ácido graxo dos fosfolipídios.

O glicerol por si só não tem um carbono quiral, mas a numeração é padronizada utilizando o sistema de numeração estereoquímico *(sn)*, que coloca o grupo do hidroxila do *C*-2 no lado esquerdo. Assim, todos os glicerolipídios são derivados do L-glicerol (Fig. 3.6). Os triglicerídios isolados de fontes naturais não são compostos puros, mas misturas de moléculas com composição de diferentes ácidos graxos, como 1-palmitoil, 2-

oleil, 3-linoleil-l-glicerol. Neles, a distribuição e o tipo de ácidos graxos variam de molécula para molécula.

Quadro de conceitos avançados

Manteiga ou margarina?

Há um intenso debate entre os nutricionistas acerca dos benefícios para a saúde quanto à utilização da manteiga e o da margarina nos alimentos. A manteiga é rica em colesterol e em triglicerídios, que contêm ácidos graxos saturados, constituindo fatores de risco da dieta para a aterosclerose. Já a margarina não contém nenhum colesterol e é mais rica em ácidos graxos insaturados.

Entretanto, os ácidos graxos insaturados na margarina são em grande parte ácidos graxos insaturados do tipo *trans* não naturais formados durante a hidrogenação parcial dos óleos vegetais. Os ácidos graxos *trans* afetam os lipídios plasmáticos da mesma maneira que os ácidos graxos saturados. Isso sugere que há riscos comparáveis associados ao consumo da manteiga ou da margarina. A resolução deste assunto é complicada, pelo fato de que há diversas formas de margarina, como as de espalhamento suave (cremosa) e as de barras duras, que variam significativamente em seu conteúdo de ácidos graxos *trans*. Os óleos parcialmente hidrogenados são mais estáveis do que os óleos naturais durante o aquecimento; quando usados para fritura com grande quantidade de óleo, necessitam ser trocados com menor frequência. Apesar da despesa adicional, as indústrias de alimento e de serviços de alimentação mudaram gradualmente para o uso de óleos naturais, ricos em ácidos graxos insaturados e sem ácidos graxos *trans*, para cozinhar e assar.

Fosfolipídios

Os fosfolipídios são os principais lipídios nas membranas biológicas

Os fosfolipídios são lipídios polares derivados do ácido fosfatídico (1,2-diacil-glicerol-3-fosfato) (Fig. 3.6). Da mesma maneira que os triglicerídios, os glicerofosfolipídios contêm um espectro de ácidos graxos na posição *sn*-1 e *sn*-2, mas a posição *sn*-3 é ocupada pelo fosfato esterificado a um composto amínico. O fosfato atua como uma ponte diéster ligando o diacilglicerídio a um composto nitrogenado polar, mais frequentemente a uma colina, a uma etanolamina ou a uma serina (Fig. 3.7). A fosfatidilcolina **(lecitina)**, por exemplo, contém geralmente o ácido palmítico ou o ácido esteárico em sua posição *sn*-1 e um ácido graxo insaturado com 18 átomos de carbono (p. ex., oleico, linoleico ou linolênico) em sua posição *sn*-2. A fosfatidiletanolamina (cefalina) costuma ter um ácido graxo poli-insaturado de cadeia mais longa na posição *sn*-2, como o ácido araquidônico. Esses lipídios complexos contribuem com carga para a membrana: a fosfatidilcolina e a fosfatidiletanolamina são *zwitterions* no pH fisiológico e não têm nenhuma carga líquida, enquanto a fosfatidilserina e o fosfatidilinositol são aniônicos. Outras estruturas

fosfolipídicas com funções especiais serão apresentadas nos próximos capítulos.

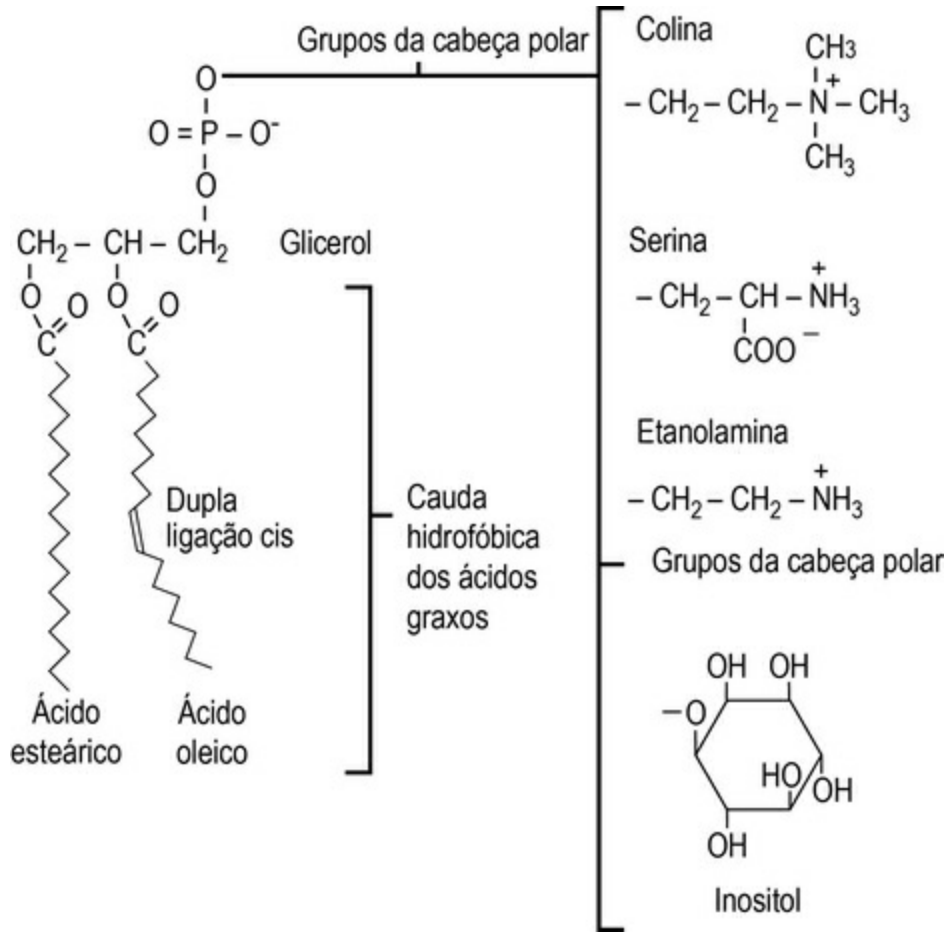


FIG. 3.7 Estrutura dos principais fosfolipídios das membranas da célula animal. Fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol (Cap. 28).

Quando dispersos em solução aquosa, os fosfolipídios formam espontaneamente estruturas lamelares e, sob circunstâncias adequadas, organizam-se em estruturas em bicamadas estendidas — não somente estruturas lamelares, mas também estruturas vesiculares fechadas denominadas **lipossomas**. O lipossoma é o modelo para a estrutura de uma membrana biológica, uma bicamada de lipídios com as porções polares expostas ao ambiente aquoso e as cadeias laterais de ácido graxo mergulhadas no interior hidrofóbico da membrana, oleoso. A superfície da membrana lipossômica, como seus componentes fosfolipídios, é uma estrutura maleável, móvel e flexível na temperatura corporal.

Quadro de conceitos avançados

Fator ativador de plaquetas e hipersensibilidade

O fator ativador de plaquetas (PAF; Fig. 3.6.) contém um grupo acetil no *C*-2 do glicerol e um grupo alquil éter saturado de 18 carbonos ligado ao grupo hidroxila do *C*-1, em vez do ácido graxo de cadeia longa habitual da fosfatidilcolina. É o mediador principal de reações de hipersensibilidade, de reações de inflamação aguda e de

choque anafilático, e afeta as propriedades de permeabilidade das membranas, aumentando a agregação plaquetária e causando mudanças cardiovasculares e pulmonares, como o edema e a hipotensão.

Em pessoas alérgicas, as células envolvidas na resposta imune tornam-se revestidas com moléculas de imunoglobulina E (IgE), que são específicas para um antígeno ou um alérgeno particular, como o pólen ou o veneno de um inseto. Quando esses indivíduos são expostos novamente a esse antígeno, os complexos de antígeno IgE formam-se na superfície das células inflamatórias e ativam a síntese e a liberação do PAF.

As membranas biológicas contêm também outro lipídio anfipático importante, o colesterol, uma molécula hidrofóbica rígida, plana, com um grupo polar hidroxila (Fig. 3.6). O colesterol é encontrado em todas as membranas biológicas e age como um modulador da fluidez da membrana. Em temperaturas mais baixas, ele interfere com as associações entre as cadeias de ácidos graxos e aumenta a fluidez e, em temperaturas mais altas, tende a limitar o distúrbio e diminuir a fluidez. As misturas colesterol-fosfolipídio têm as propriedades intermediárias entre os estados de gel e de líquido cristalino dos fosfolipídios puros; eles formam estruturas de membrana estáveis, porém flexíveis.

Estrutura das membranas biológicas

As células eucarióticas têm uma membrana plasmática e membranas intracelulares que definem compartimentos com funções especializadas

Membranas celulares e organelas distinguem-se significativamente em proteínas e composição lipídica (Tab. 3.3). Além dos principais fosfolipídios descritos na Figura 3.7, outros importantes lipídios de membrana são a cardiolipina, os esfingolipídios (esfingomielina e glicolipídios) e o colesterol, que são descritos detalhadamente nos próximos capítulos. A cardiolipina (difosfatidil glicerol) é um componente significativo da membrana interna mitocondrial, enquanto a esfingomielina, a fosfatidilserina e o colesterol estão enriquecidos na membrana plasmática (Tab. 3.3). Alguns lipídios estão distribuídos assimetricamente na membrana; por exemplo, a fosfatidilserina e a fosfatidiletanolamina estão preferencialmente na face interna, e a fosfatidilcolina e a esfingomielina, na face externa da membrana dos glóbulos vermelhos do sangue. A proporção de proteína em relação ao lipídio difere também entre as várias membranas biológicas, variando de aproximadamente 80% de lipídios (peso seco) na bainha de mielina, que isolam as células nervosas, a cerca de 20% na membrana mitocondrial interna. Os lipídios afetam a estrutura da membrana, a atividade de sistemas de transporte e das enzimas da membrana e a função da membrana em processos como o reconhecimento celular e a transdução de sinal. A exposição da fosfatidilserina no folheto externo da membrana plasmática do eritrócito aumenta a aderência da célula à parede vascular e é um sinal para o reconhecimento do macrófago e da fagocitose. Ambos os

processos de reconhecimento contribuem para o processo natural de reciclagem (*turnover*) de glóbulos vermelhos no baço.

Tabela 3.3

Composição fosfolipídica das membranas de organelas de fígado de rato

	Mitocôndria	Microssomo	Lisossomo	Membrana plasmática	Membrana nuclear	Membrana de Golgi
Cardiolipina	18	1	1	1	4	1
Fosfatidiletanolamina	35	22	14	23	13	20
Fosfatidilcolina	40	58	40	39	55	50
Fosfatidilinositol	5	10	5	8	10	12
Fosfatidilserina	1	2	2	9	3	6
Ácido fosfatídico	—	1	1	1	2	<1
Esfingomielina	1	1	20	16	3	8
Fosfolipídios (mg/mg proteína)	0,18	0,37	0,16	0,67	0,50	0,83
Colesterol (mg/mg proteína)	<0,01	0,01	0,04	0,13	0,04	0,08

Esta tabela mostra a composição fosfolipídica (%) de várias membranas de organelas junto com a proporção em peso entre fosfolipídios e colesterol e proteínas.

O modelo do mosaico fluido

O modelo do mosaico fluido representa as membranas celulares como bicamadas lipídicas flexíveis com proteínas embutidas

O modelo de estrutura de membrana biológica geralmente aceito é o do mosaico fluido, proposto por Singer e Nicolson em 1972. Esse modelo representa a membrana como uma bicamada de fosfolipídios fluida, na qual outros lipídios e proteínas estão embebidos (Fig. 3.8). Como nos lipossomas, os grupos das cabeças polares dos fosfolipídios estão expostos nas superfícies externas da membrana, com as cadeias acilas dos ácidos graxos orientadas para o interior da membrana. Enquanto os lipídios e as proteínas da membrana se movem facilmente na superfície da membrana (difusão lateral), o movimento dos lipídios do tipo *flip-flop* entre os folhetos externo e interno da bicamada ocorre raramente sem a presença da enzima da membrana flipase.

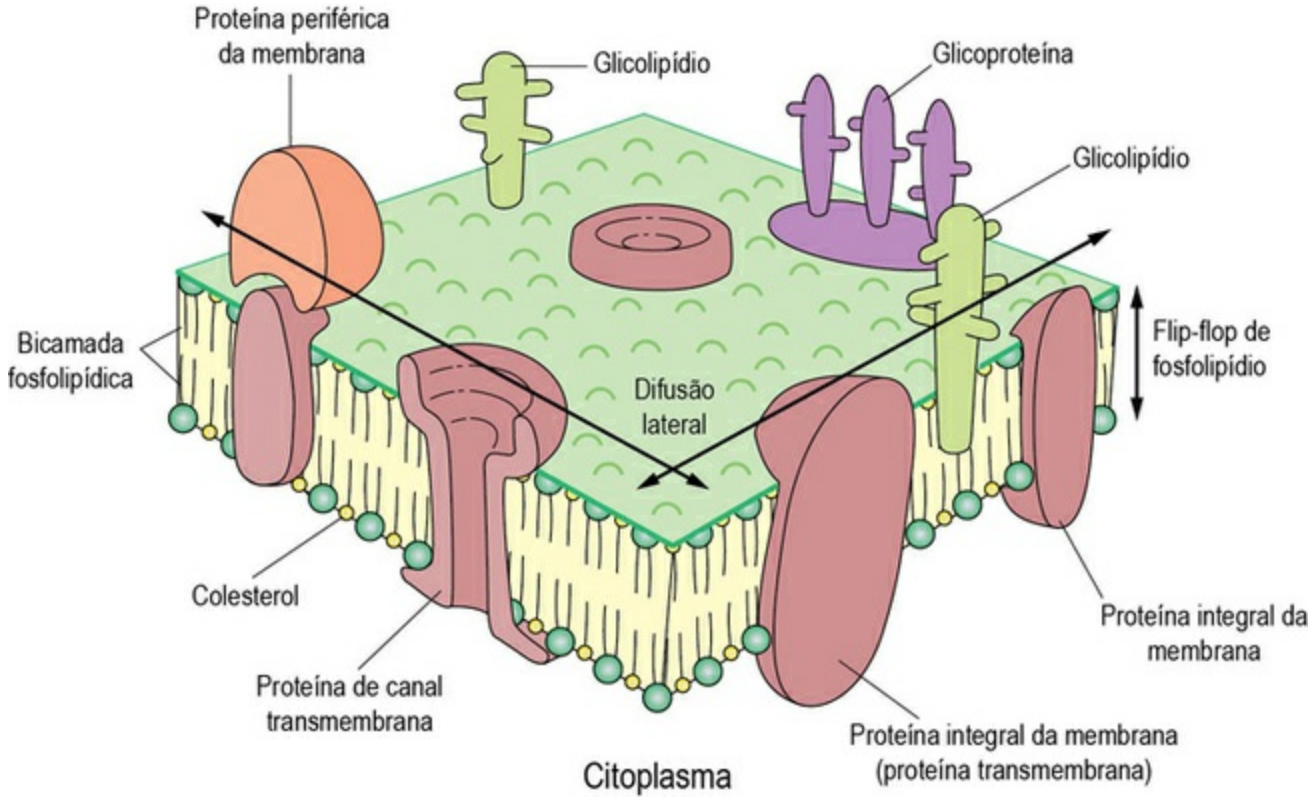


FIG. 3.8 Modelo do mosaico fluido para a membrana plasmática. Nesse modelo, as proteínas estão embebidas em uma bicamada fosfolipídica fluida; algumas estão na superfície (periféricas) e outras atravessam a membrana (transmembrana). Os carboidratos, ligados covalentemente a algumas proteínas e lipídios, não são encontrados em todas as membranas subcelulares, como a membrana mitocondrial. Na membrana plasmática, eles se localizam quase exclusivamente na superfície externa da célula (Cap. 8 e 28).

As proteínas da membrana são classificadas como proteínas de membrana integrais (intrínsecas) ou periféricas (extrínsecas). As primeiras estão superembebidas na bicamada lipídica e algumas delas atravessam a membrana diversas vezes **(proteínas transmembrana)** e possuem segmentos de polipeptídios tanto internos quanto externos que participam de processos regulatórios. Por outro lado, as proteínas de membrana periféricas estão ligadas a lipídios da membrana e/ou às proteínas integrais da membrana (Fig. 3.8); elas podem ser removidas da membrana por agentes desnaturantes suaves, como a ureia, ou por tratamento com detergente suave, sem destruir a integridade da membrana. Ao contrário, as proteínas transmembrana podem ser removidas da membrana utilizando apenas tratamentos que dissolvem os lipídios da membrana e destroem a integridade da membrana. A maioria dos segmentos transmembrana das proteínas de membrana integrais formam α-hélices. Eles são compostos, principalmente, de resíduos de aminoácidos com as cadeias laterais apolares — cerca de 20 resíduos de aminoácidos formando seis a sete voltas em α-hélice são suficientes para atravessar uma membrana de uma espessura de 5 nm (50 Å). Os domínios transmembrana interagem uns com os outros e com as caudas hidrofóbicas das moléculas de lipídios, formando frequentemente estruturas complexas, como os canais envolvidos em processos de transporte de íons (Fig. 3.8 e Cap. 8).

As membranas mantêm as funções de integridade estrutural, de reconhecimento celular e de transporte da célula

Há evidências crescentes de que muitas proteínas da membrana têm mobilidade limitada e estão ancoradas no lugar por ligação às proteínas do citoesqueleto. As subestruturas da membrana, descritas como "jangadas lipídicas", demarcam também regiões das membranas com composição e função especializadas. As regiões da membrana envolvidas na endocitose e nas junções com as células adjacentes são ricas também em fosfolipídios específicos. No entanto, a fluidez é essencial para a função da membrana e para a viabilidade celular. Por exemplo, quando as bactérias são transferidas para uma temperatura mais baixa, elas respondem aumentando o conteúdo de ácidos graxos insaturados na membrana fosfolipídica, mantendo a fluidez da membrana na temperatura baixa. A membrana também medeia a transferência da informação e de moléculas entre o exterior e o interior da célula, como o reconhecimento celular, os processos de transdução de sinal e o transporte de metabólitos e de íons; a fluidez é essencial para essas funções. Todas as membranas celulares, que são vistas frequentemente ao microscópio como estáticas, são estruturas bem organizadas, flexíveis e responsivas. De fato, a imagem do microscópio é como uma fotografia de uma ação de alta velocidade; pode parecer tranquila e quieta, mas há muitas ações ocorrendo.



Quadro de conceitos avançados

Patches da membrana

Embora o modelo do mosaico fluido esteja basicamente correto, é reconhecido que há regiões da membrana com composições de proteína e de lipídios singulares. As **cavéolas**, invaginações da membrana plasmática de 50-100 nm, e as jangadas lipídicas são trechos *(patches)* da membrana plasmática (microdomínios) importantes para a transdução de sinal e a endocitose. Esses trechos são ricos em colesterol e esfingolipídios, e a interação das caudas dos ácidos graxos insaturados de cadeia longa dos esfingolipídios com o colesterol resulta na estabilização do ambiente fluido.

Os *patches* são insolúveis em detergente e apresentam elevada densidade flutuante na centrifugação com gradiente de densidade em sacarose. Patógenos como vírus, parasitas, bactérias e mesmo toxinas bacterianas podem penetrar na célula do hospedeiro por meio da ligação com componentes específicos das cavéolas. Os exemplos clássicos dos *patches* enriquecidos com uma proteína particular são a membrana púrpura de *Halobacterium halobium*, que contém a bacteriorodopsina, e as junções comunicantes (do tipo *gap*) com conexina. A bacteriorodopsina é uma bomba de prótons ativada pela luz que gera um gradiente de concentração de H^+ por meio da membrana bacteriana, fornecendo a energia para a captação de nutriente para o crescimento bacteriano. As **junções comunicantes** entre as células musculares uterinas aumentam significativamente durante os últimos estágios da gravidez. Elas fornecem canais de alta capacidade entre as células e possibilitam a contração coordenada do útero durante o trabalho de parto.

Quadro de conceitos avançados

Distúrbio da membrana por compostos anfipáticos

Os compostos anfipáticos têm porções polares e apolares distintas. Eles englobam muitos anestésicos e tranquilizantes. As atividades farmacológicas desses compostos dependem de sua habilidade de interagir com as membranas e de perturbar a estrutura da membrana. Vários antibióticos e produtos naturais, como os sais biliares e os ácidos graxos, também são anfipáticos. Embora efetivas em concentrações terapêuticas, alguns desses fármacos exibem ação semelhante a um detergente em concentrações moderadas a elevadas e perturbam a estrutura da bicamada, o que resulta no rompimento da membrana.

Quadro de conceitos avançados

Ancoragem de proteínas na membrana

Os movimentos laterais de algumas proteínas da membrana são restringidos pela interação das proteínas com os conjuntos macromoleculares localizados no interior (citoesqueleto) e/ou no exterior (matriz extracelular) da célula e, em alguns casos, com as proteínas da membrana de células adjacentes, como em junções do tipo *tight junctions* entre as células epiteliais. A difusão lateral das proteínas integrais da membrana do eritrócito, a banda 3 (um transportador de ânion) e a glicoforina, é limitada pela interação indireta com a espectrina, uma proteína do citoesqueleto, por meio das proteínas ancirina e banda 4.1, respectivamente. Tais interações são tão fortes que limitam a difusão lateral da proteína banda 3. Defeitos genéticos na espectrina causam a esferocitose e a eliptocitose hereditárias, doenças caracterizadas pela alteração da morfologia da hemácia. A mutação na anquirina afeta a localização de proteínas da membrana plasmática no músculo cardíaco, causando arritmia cardíaca, um fator de risco para a morte súbita cardíaca.

Resumo

Depois do capítulo anterior sobre aminoácidos e proteínas, este oferece fundamentos mais amplos para estudos mais avançados na bioquímica, apresentando as características estruturais básicas e as propriedades físicas e químicas de dois principais blocos estruturais: os carboidratos e os lipídios.

- Os carboidratos são poli-hidroxialdeídos e cetonas; existem principalmente em formas cíclicas, ligadas umas às outras por ligações glicosídicas.
- A glicose é o único monossacarídio que existe no organismo na forma livre.
- A lactose e a sacarose são importantes dissacarídios da dieta.
- O amido, a celulose e o glicogênio são importantes polímeros de glucose homoglicanas.

- Os carboidratos podem se ligar a proteínas e lipídios para formar glicoconjugados, conhecidos como glicolipídios e glicoproteínas.
- Os lipídios são compostos hidrofóbicos, frequentemente contendo ácidos graxos esterificados com glicerol.
- Os ácidos graxos são ácidos de alcanos de cadeia longa; os ácidos graxos insaturados contêm uma ou mais duplas ligações *cis*, as quais reduzem o ponto de fusão (congelação) dos lipídios.
- Os triglicerídios (triacilgliceróis) são a forma de armazenamento dos lipídios no tecido adiposo.
- Os fosfolipídios são lipídios anfipáticos que se encontram em membranas biológicas; contêm uma ponte diéster na posição *C*-3 do glicerol, ligando um diacilglicerídio a um composto nitrogenado, mais frequentemente a colina, a etanolamina ou a serina.
- O modelo do mosaico fluido descreve o papel essencial dos fosfolipídios, das proteínas integrais e de membrana e de outros lipídios na estrutura e na função das membranas biológicas.
- As membranas biológicas compartilham as funções celulares, mediando igualmente o transporte de íons e metabólitos, o reconhecimento celular, a transdução de sinal e os processos eletroquímicos envolvidos na bioenergética, na transmissão nervosa e na contração muscular.

Questões para aprendizagem

1. Compare o valor calórico do amido e da celulose. Explique a diferença.
2. Explique por que dissacarídios como a lactose, a maltose e a isomaltose são açúcares redutores, mas a sacarose não.
3. O que o índice de iodo de um lipídio sugere sobre sua estrutura?
4. Reveja o processo industrial para fazer sabões.
5. Reveja a história dos modelos para as membranas biológicas. Quais são as limitações do modelo original de Singer-Nicolson?

Leituras sugeridas

Brand-Miller, J., Buyken, A. E. The glycemic index issue. *Curr Opin Lipidol*. 2012; 23:62–67.

Kar, S., Webel, R. Fish oil supplementation and coronary artery disease: does it help? *Mo Med*. 2012; 109:142–145.

Kusumi, A., Fujiwara, T. K., Chadda, R., et al. Dynamic organizing principles of the plasma membrane that regulate signal transduction: commemorating the fortieth anniversary of Singer and Nicolson's fluid-mosaic model. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2012; 28:215–250.

Shanmugam, T., Banerjee, R. Nanostructured self-assembled lipid materials for drug delivery and tissue engineering. *Ther Deliv*. 2011; 2:1485–1516.

Singer, S. J. Some early history of membrane molecular biology. *Annu Rev Physiol*. 2004; 66:1–27.

Taubes, G. *Good calories, bad calories: fats, carbs, and the controversial science of diet and health*. New York: Anchor Books; 2008. [pp 609].

Zhang, Y. M., Rock, C. O. Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nat Rev Microbiol*. 2008; 6:222–233.

Sites

History of membrane models: www1.umn.edu/ships/9-2/membrane.htm.
Soaps and saponification: www.kitchendoctor.com/articles/soap.html.

CAPÍTULO 4

Sangue: Células e Proteínas Plasmáticas

Marek H. Dominiczak and William D. Fraser

Objetivos

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever os principais componentes do sangue.
- Explicar a diferença entre plasma e soro.
- Definir as funções das proteínas plasmáticas e suas amplas classificações.
- Identificar as doenças associadas à deficiência de proteínas específicas.
- Discutir a estrutura e a função das imunoglobulinas.
- Avaliar a importância patológica da gamopatia monoclonal.
- Definir a resposta de fase aguda e a alteração que esta induz nas concentrações das proteínas plasmáticas circulantes.

Introdução

Para um clínico, o plasma é uma importante "janela" sobre o metabolismo

O sangue é o meio de transporte e de distribuição para o corpo. Ele entrega nutrientes essenciais aos tecidos e remove produtos de excreção. É uma solução aquosa com moléculas de tamanho variável e diversos elementos celulares. Alguns dos componentes do sangue desempenham importantes funções na defesa do organismo contra insultos externos e na reparação de tecidos danificados. Para um clínico, o plasma é também uma importante "janela" sobre o metabolismo. Uma vez que é fácil a coleta, a maioria dos testes laboratoriais de diagnóstico em bioquímica, hematologia e imunologia é realizada em amostras de plasma.

O plasma é o ambiente natural das células sanguíneas, mas muitas dosagens químicas são feitas com soro

Os elementos figurados do sangue encontram-se suspensos em uma solução aquosa: o plasma. O **plasma** é o sobrenadante obtido após centrifugação de sangue coletado em um tubo de ensaio contendo **anticoagulante** para evitar a coagulação. São usados vários anticoagulantes na prática laboratorial, sendo os mais comuns o heparinato de lítio e o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). O heparinato evita a coagulação por ligação à trombina. O EDTA e o citrato ligam os íons Ca^{2+} e Mg^{2+}, interferindo na ação das enzimas dependentes do cálcio e do magnésio envolvidas na cascata de coagulação (Cap. 7). O citrato é usado como anticoagulante quando o sangue é coletado para transfusão.

O **soro**, por outro lado, é o sobrenadante obtido após uma amostra de sangue ter sido deixada coagulando espontaneamente (o que, geralmente, requer 30-45 minutos). Durante a coagulação, o fibrinogênio é convertido em fibrina como resultado da quebra proteolítica pela trombina, cuja grande diferença entre o plasma e o soro é a ausência de fibrinogênio no soro.

Ao longo deste livro, quando descrevemos mecanismos fisiológicos ou patológicos, referimo-nos ao plasma. Por exemplo, suponhamos que a albumina liga vários fármacos presentes no *plasma*. Podemos mencionar o soro quando nos referimos especificamente aos resultados de testes laboratoriais realizados no soro, em particular; por exemplo, diríamos que a albumina *sérica* de um paciente era de 40 mg/dL.

Elementos figurados do sangue

Existem três componentes principais do sangue: os glóbulos vermelhos (eritrócitos), os glóbulos brancos (leucócitos) e as plaquetas sanguíneas (trombócitos).

Os eritrócitos não são células completas, visto que não têm núcleo nem organelas intracelulares

Os eritrócitos são remanescentes celulares, com íons e proteínas específicas, os quais podem estar presentes em altas concentrações. São o produto final da eritropoese na medula óssea, a qual está sob controle da eritropoetina produzida pelos rins (Fig. 4.1). A hemoglobina é sintetizada nas células precursoras de eritrócitos (eritroblastos e reticulócitos) sob um forte controle regido pela concentração de heme (Cap. 30). As principais funções dos eritrócitos são o transporte de oxigênio e a remoção de dióxido de carbono. Íons hidrogênio, como não têm organelas, não são capazes de sintetizar proteínas nem efetuar reparo (Cap. 5 e 25). Consequentemente, os eritrócitos têm uma duração de vida limitada de cerca de 120 dias antes de serem capturados e degradados no baço.

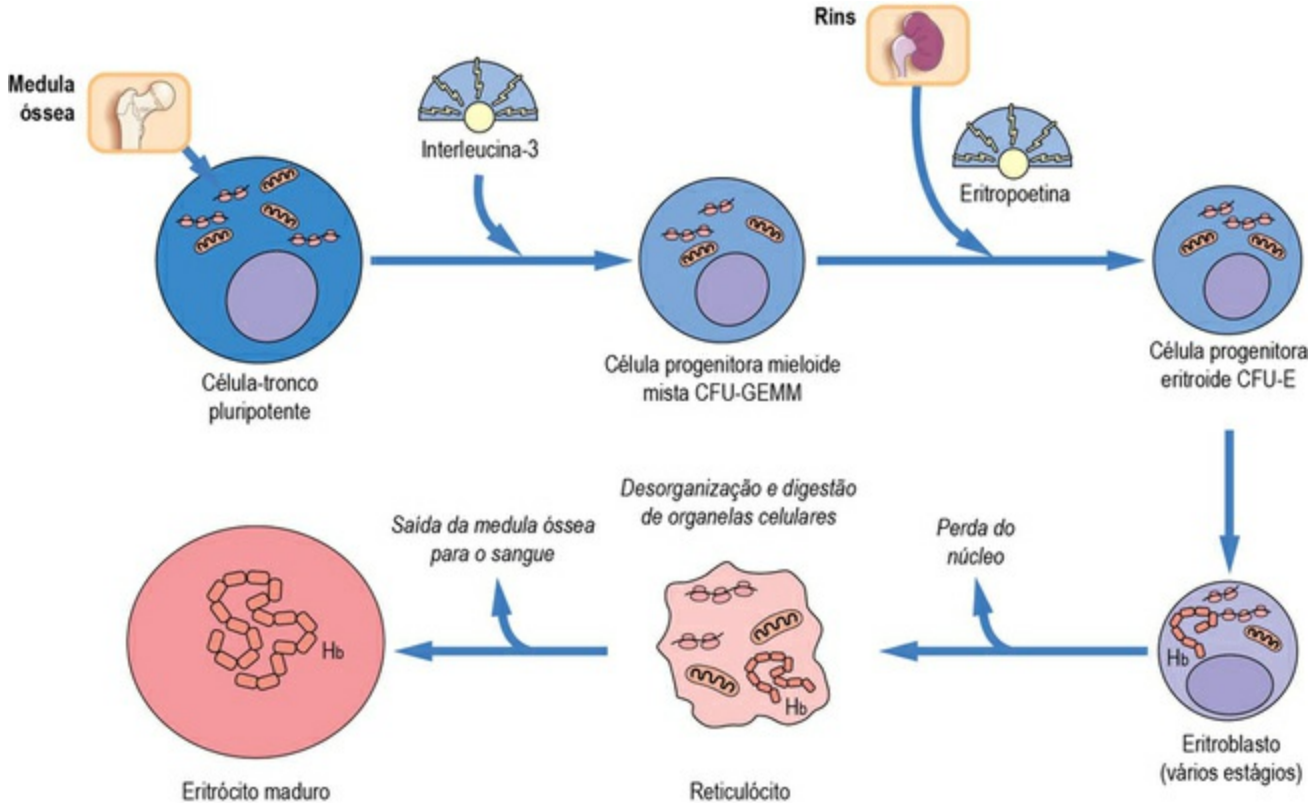


FIG. 4.1 Esquema simplificado da formação dos eritrócitos.
Em média, 10^{11} eritrócitos são formados por dia. A hemoglobina é sintetizada no interior do eritrócito e do reticulócito antes da perda dos ribossomos e da mitocôndria. CFU-GEMM, unidade formadora de colônias: granulócitos, eritrócitos, monócitos, megacariócitos; CFU-E, unidade formadora de colônias de eritrócitos.

Os leucócitos são células cuja função principal é proteger o organismo de infecções (Cap. 38)

A maioria dos leucócitos é produzida na medula óssea; alguns são produzidos no timo e outros se tornam maduros no interior de diversos tecidos (Fig. 4.2) (Cap. 38). Os leucócitos são capazes de controlar sua própria síntese pela secreção no sangue de peptídios sinalizadores que, consequentemente, agem nas células-tronco da medula óssea. Para que desempenhem sua função corretamente, os leucócitos têm a capacidade de migrar para fora da corrente sanguínea penetrando em tecidos circundantes.

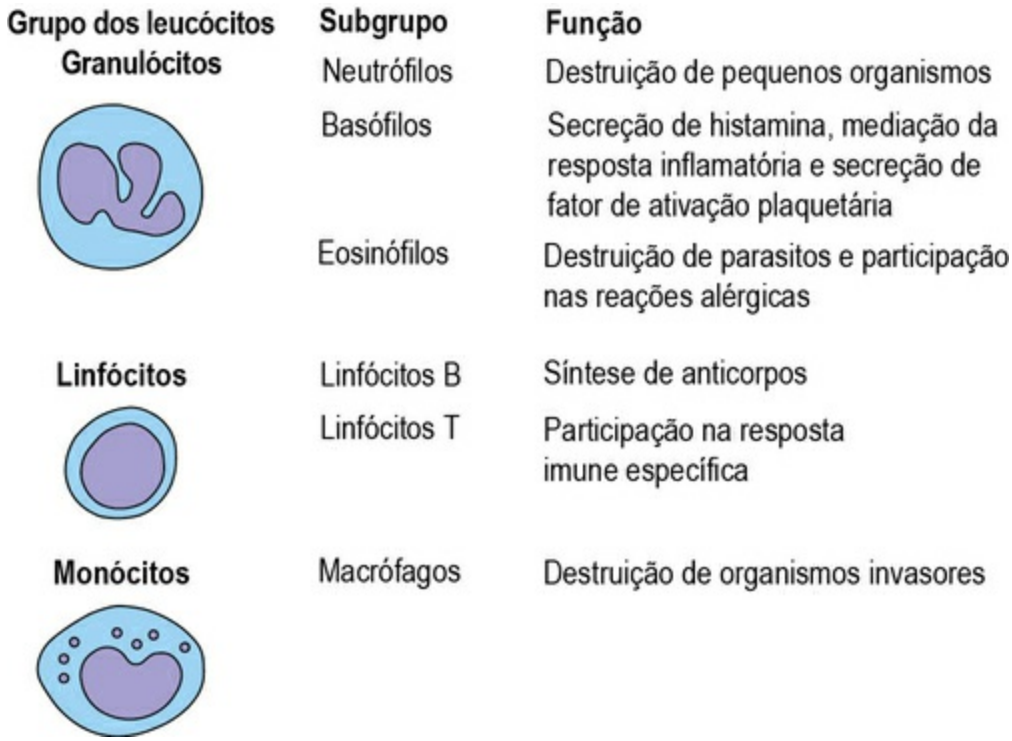


FIG. 4.2 Leucócitos.
Classificação e funções dos leucócitos (Cap. 38).

Os trombócitos não são células verdadeiras, e sim fragmentos envoltos por membrana derivados de megacariócitos

Eles se localizam na medula óssea. Têm papel-chave na coagulação sanguínea (Cap. 7).

Proteínas plasmáticas

As proteínas plasmáticas podem ser, de modo geral, classificadas em dois grupos: aquelas incluindo albumina, que são sintetizadas pelo fígado, e as imunoglobulinas, as quais são produzidas pelos plasmócitos da medula óssea, geralmente como parte da resposta imunológica.

Grande número de proteínas plasmáticas tem a capacidade de se associar a certos ligantes com alta afinidade e especificidade. Essas proteínas podem atuar como um reservatório para o ligante e auxiliar a controlar sua distribuição e sua disponibilidade ao transportá-las para os tecidos ao longo do corpo. A ligação de uma proteína também pode tornar uma substância tóxica menos nociva para os tecidos. As principais proteínas de ligação e seus ligantes são mostrados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1

Proteínas transportadoras e seus ligantes

Proteínas	Ligantes
Ligadoras de cátion	
Albumina	Cátions divalentes e trivalentes (p. ex., Cu^{2+}, Fe^{3+})
Ceruloplasmina	Cu^{2+}
Transferrina	Fe^{3+}
Ligadoras de hormônios	
Globulina ligadora de tiroxina (TBG)	Tiroxina (T_4), tri-iodotironina (T_3)
Globulina ligadora de cortisol (CBG)	Cortisol
Globulina ligadora de hormônio sexual (SHBG)	Andrógenos (testosteronas), estrógenos (estradiol)
Hemoglobina/ligadora de protoporfirina	
Albumina	Heme, bilirrubina, biliverdina
Haptoglobina	Dímeros de hemoglobina
Ligadoras de ácidos graxos	
Albumina	Ácidos graxos não esterificados, esteroides

Albumina

A albumina é um regulador osmótico e a principal proteína de transporte

A albumina é a proteína plasmática predominante. Não tem atividade enzimática ou hormonal conhecida e representa, aproximadamente, 50% das proteínas encontradas no plasma humano. Sua concentração normal é de 35-45 g/L. Com um peso molecular de cerca de 66 kDa, a albumina tem uma natureza altamente polar e dissolve-se facilmente em água. A um pH 7,4, ela é um ânion com 20 cargas negativas por molécula; isso lhe confere uma elevada capacidade de ligação não seletiva de muitos ligantes. Desempenha também papel fundamental na manutenção da pressão osmótica do plasma.

A taxa de síntese de albumina (14-15 g por dia) depende do estado nutricional do indivíduo, especialmente no nível de deficiências de aminoácidos. A meia-vida da albumina fica em torno de 20 dias. Além disso, embora os níveis de albumina reflitam o estado nutricional a longo prazo, em pacientes hospitalizados as alterações a curto prazo na concentração de albumina plasmática ocorrem geralmente devido a mudanças na hidratação (Cap. 24).

A albumina é a principal proteína plasmática responsável pelo transporte de ácidos graxos hidrofóbicos, bilirrubina e fármacos

A albumina pode ligar (e, assim, solubilizar) uma série de substâncias, como os ácidos graxos de cadeia longa, os esteróis e vários compostos sintéticos. O transporte dos ácidos

graxos de cadeia longa serve de base para distribuir pelo organismo diversos substratos ricos em energia. Há muitos sítios de ligação para os ácidos graxos na molécula de albumina com afinidades variadas. Acredita-se que os sítios de maior afinidade estejam situados em segmentos globulares dentro de fendas especializadas da molécula de albumina (Fig. 4.3).

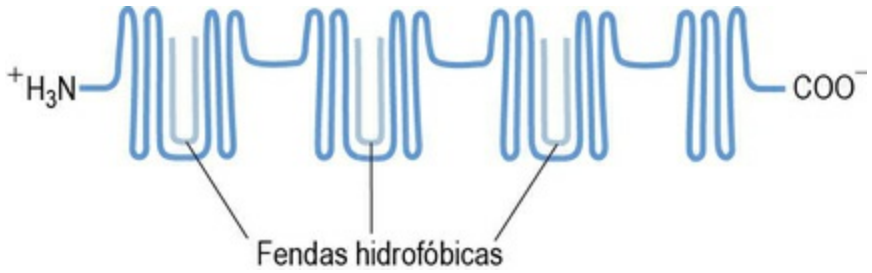


FIG. 4.3 Modelo molecular da albumina humana.
As fendas hidrofóbicas são segmentos globulares da albumina que ligam ácidos graxos com alta afinidade.

Além da ligação a ácidos graxos, a albumina liga a bilirrubina não conjugada (Cap. 30). Os sítios na molécula de albumina também são capazes de ligar uma série de fármacos, como salicilatos, barbitúricos, sulfonamidas, penicilina e varfarina, e são de grande relevância farmacológica. Tais interações são fracas e os ligantes tornam-se facilmente deslocados do sítio de ligação por substâncias concorrentes. Surpreendentemente, de certo modo a albumina não é essencial para a sobrevivência humana, e raros defeitos congênitos já foram descritos em que existe hipoalbuminemia ou completa ausência de albumina (analbuminemia).

Proteínas transportadoras de íons metálicos

A transferrina transporta ferro

A ligação dos íons férricos na transferrina (Fe^{3+}) protege contra os efeitos tóxicos desses íons. Em reações inflamatórias, o complexo ferro-transferrina é degradado pelo sistema reticuloendotelial sem um aumento correspondente na síntese de seus componentes: isso resulta em baixas concentrações plasmáticas de transferrina e ferro (Cap. 11).

A ferritina é a principal proteína de armazenamento de ferro encontrada em quase todas as células do organismo

A ferritina age como reservatório de ferro no fígado e na medula óssea. A concentração de ferritina no plasma é proporcional à quantidade de ferro armazenado; assim, a dosagem de ferritina plasmática é um dos melhores indicadores de deficiência de ferro.

A ceruloplasmina é a principal proteína transportadora de cobre

A ceruloplasmina auxilia a exportação de cobre do fígado para os tecidos periféricos e é fundamental para regulação das reações de oxidação e redução, transporte e utilização de

ferro (Fig. 4.4). Ocorrem concentrações elevadas de ceruloplasmina em doenças hepáticas e em lesões teciduais.

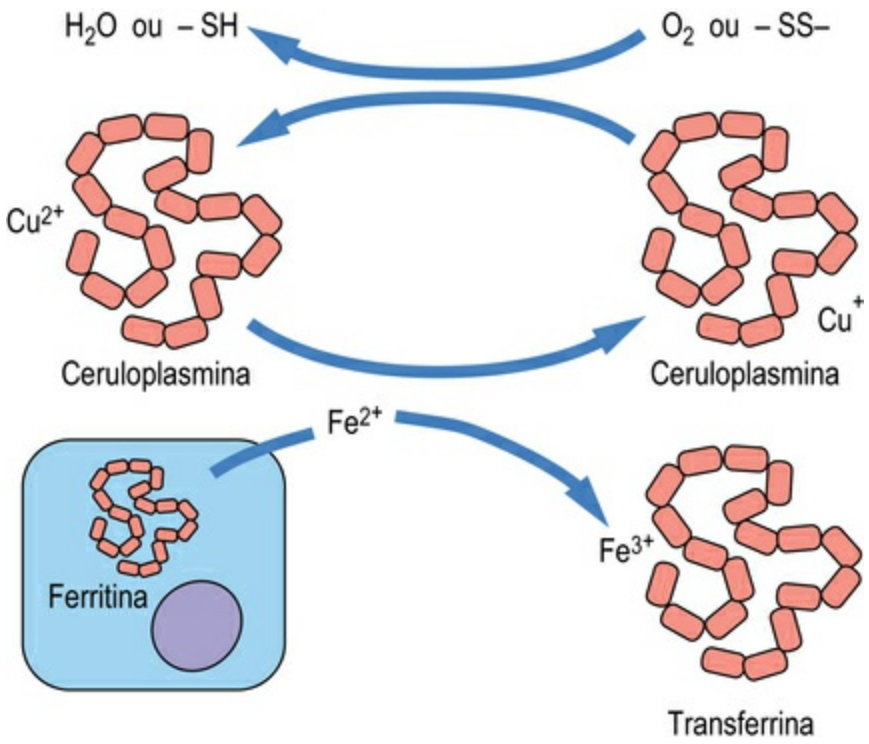


FIG. 4.4 Atividade ferroxidase da ceruloplasmina plasmática.
A oxidação de Fe^{2+} pela ceruloplasmina possibilita a ligação e o transporte do ferro pela transferrina plasmática. O íon cuproso (Cu^{2+}) ligado à ceruloplasmina é regenerado pela reação com oxigênio e grupamentos tiol oxidados.

Imunoglobulinas

Imunoglobulinas são proteínas produzidas em resposta a substâncias estranhas (antígenos; Cap. 38)

As imunoglobulinas (anticorpos) são secretadas pelos linfócitos B. Elas têm especificidade definida para as substâncias estranhas que estimularam sua síntese. Entretanto, nem todas as substâncias estranhas que penetram no organismo podem produzir essa resposta. Aquelas que têm essa capacidade são chamadas de **imunógenos**, enquanto qualquer agente que pode se ligar a um anticorpo é denominado **antígeno**. As imunoglobulinas formam um grupo de moléculas singularmente diverso, reconhecendo e reagindo especificamente com diversas estruturas antigênicas **(epítopos)**, as quais resultam no aumento de uma série de efeitos que levam à eventual eliminação do antígeno apresentado. Algumas imunoglobulinas têm funções efetoras adicionais: por exemplo, a IgG está envolvida na ativação do complemento.

Quadro de conceitos avançados

Hemólise e hemoglobina livre

Quando os eritrócitos são hemolisados, eles liberam hemoglobina para o plasma, onde ela se dissocia a dímeros que se ligam à **haptoglobina**. O complexo hemoglobina-haptoglobina é metabolizado mais rapidamente do que a haptoglobina sozinha, no fígado e no sistema reticuloendotelial, produzindo um complexo ferro-globulina e bilirrubina. Isso evita a perda de ferro na urina. Quando ocorre hemólise excessiva, a concentração de haptoglobina plasmática pode ficar muito baixa e, como tal, serve como um **marcador de hemólise.** Se a hemoglobina se dissocia em heme e globina, o heme livre liga-se à hemopexina. Ao contrário da haptoglobina, uma proteína de fase aguda, a hemopexina não é afetada pela resposta de fase aguda. O complexo heme-hemopexina é capturado pelas células hepáticas, nas quais o ferro se liga à ferritina. Um terceiro complexo chamado metemalbumina pode ser formado entre o heme oxidado e a albumina. Esses mecanismos evoluíram para que o organismo não apenas evite mais perdas de ferro, mas também complexe o heme livre, o qual é tóxico para vários tecidos.

As imunoglobulinas compartilham uma estrutura em forma de Y comum composta de duas cadeias pesadas e duas cadeias leves

Uma imunoglobulina é uma molécula em forma de Y que contém duas unidades idênticas denominadas cadeias pesadas (H) e outras duas unidades idênticas, porém menores, chamadas de cadeias leves (L). Existem várias cadeias H, e a natureza dessas cadeias determina a classe de imunoglobulina: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE são caracterizadas por cadeias pesadas α, γ, δ, μ e ε, respectivamente. As cadeias L são apenas de dois tipos, κ e λ. Cada cadeia polipeptídica de uma imunoglobulina caracteriza-se por uma série de regiões globulares, as quais têm uma considerável homologia em sua sequência e, em termos evolutivos, são provavelmente derivadas da duplicação de um protogene.



Quadro clínico

Uma menina de 14 anos com dor abdominal e fígado aumentado: doença de wilson

Uma menina de 14 anos foi atendida no setor da emergência de um hospital. Ela estava ictérica, com dor abdominal e tinha o fígado sensível e aumentado, com sonolência e asterixe (tremores oscilantes) devido à insuficiência hepática aguda. A história pregressa revelou transtornos de comportamento, dificuldade de realizar movimentos em passado recente e ausência às aulas do colégio. Sua concentração de ceruloplasmina era de 50 mmol/L (faixa normal 200-450 mmol/L (20-45 mg/dL)), a do cobre sérico era de 8 mmol/L (faixa normal 10-22 μmol/L (65-144 μg/dL)), a excreção urinária de cobre era de 2,2 mmol/24 h (faixa normal 2-3,9 μmol/24 h (13-25 μg/dL)) e a

biopsia do fígado estabeleceu o dignóstico de doença de Wilson.

Comentário

Esse caso destaca a importância da dosagem de ceruloplasmina. **Na doença de Wilson, uma deficiência de ceruloplasmina acarreta baixas concentrações de cobre no plasma.** Essa falha metabólica está na excreção de cobre na bile e na sua reabsorção pelos rins; o cobre é depositado no fígado, no cérebro e nos rins. Os sintomas hepáticos estão presentes em pacientes mais jovens, e a cirrose e os problemas neuropsiquiátricos são predominantes naqueles que são mais velhos. A detecção de baixas concentrações de ceruloplasmina e cobre no plasma, a excreção urinária do cobre aumentada e os aumentos acentuados de cobre no fígado confirmam o diagnóstico.

Os domínios *N*-terminais de ambas as cadeias H e L contêm uma região cuja sequência de aminoácidos é variável (a região V); juntas, essas regiões determinam a especificidade antigênica. As cadeias H e L são necessárias para a atividade completa do anticorpo, já que as regiões V fisicamente justapostas às cadeias L e H formam um complexo funcional no qual o epítopo se encaixa. Essa porção da molécula é denominada região de reconhecimento do anticorpo ($F(ab'_2)$). O domínio imediatamente adjacente à região V, tanto da cadeia H quanto da L, tem variabilidade muito menor. O restante da cadeia H consiste em uma região constante (região Fc) formada pela região de dobradiças e dois domínios adicionais. Essa região constante é responsável por outras funções da imunoglobulina, além do reconhecimento do epítopo, como a ativação do complemento (Cap. 38). Essa estrutura básica das imunoglobulinas está representada na Figura 4.5. Quando um antígeno se liga a uma imunoglobulina, alterações conformacionais são transmitidas ao longo da região da dobradiça do anticorpo até a região Fc, a qual se torna ativada.

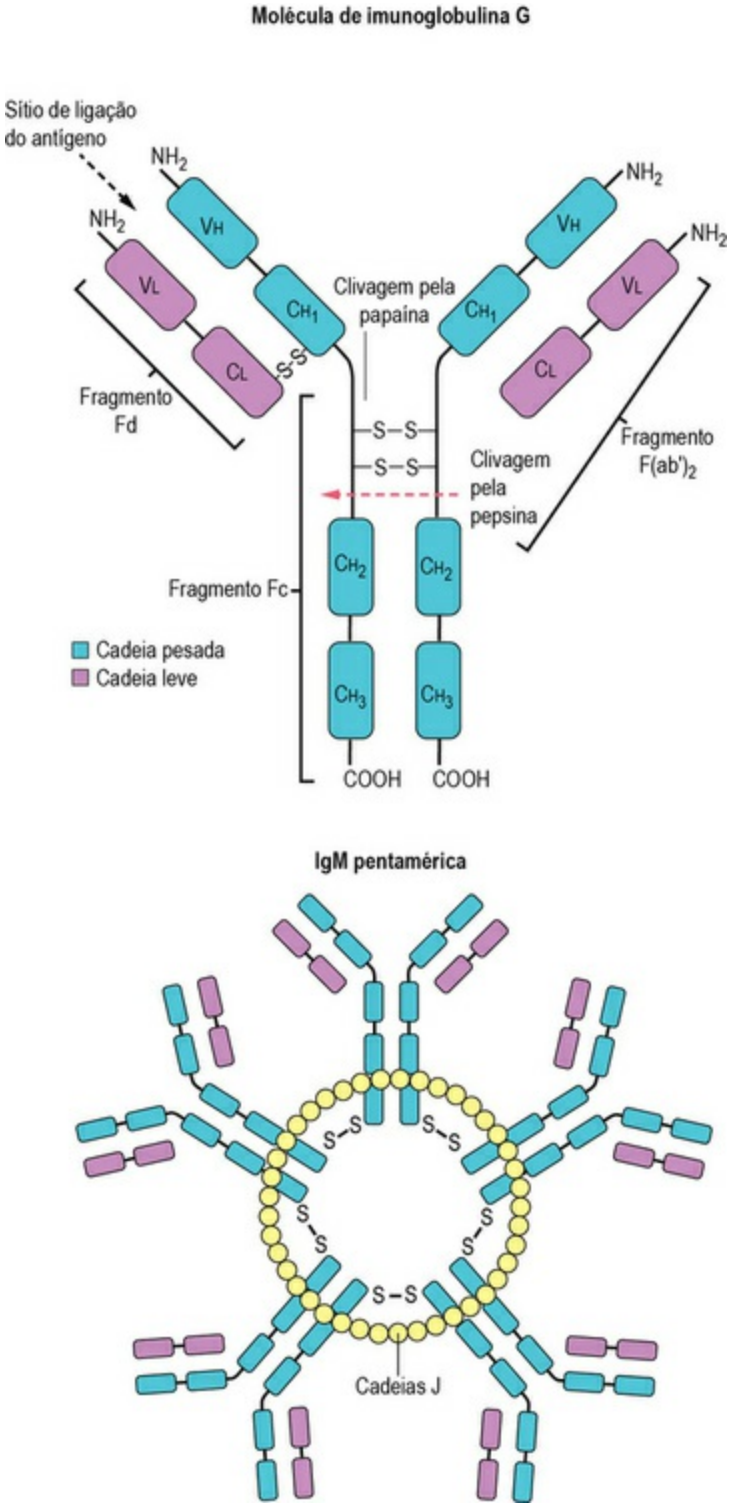


FIG. 4.5 A estrutura das imunoglobulinas.
Diagrama representando a estrutura básica de uma imunoglobulina monomérica e de uma imunoglobulina pentamérica (IgM). V, região variável; C, região constante; H, cadeia pesada; L, cadeia leve; cadeia J, cadeia de junção; Fab_2, fragmento gerado pela clivagem da molécula pela pepsina; Fc, Fd, fragmentos produzidos pela ação proteolítica da papaína.

Principais imunoglobulinas

A IgG é a imunoglobulina mais comum, que protege os espaços teciduais e atravessa a placenta livremente

A IgG tem massa molecular total de 160 kDa e consiste na subunidade básica 2H2L da imunoglobulina unida por um número variável de pontes dissulfeto. As cadeias γH têm

várias diferenças antigênicas e estruturais, o que possibilita a classificação da IgG em diversas subclasses de acordo com o tipo de cadeia H presente. Entretanto, as diferenças funcionais entre as subclasses não são relevantes.

A IgG circula em altas concentrações no plasma, representando cerca de 75% das imunoglobulinas presentes em adultos e com uma meia-vida de 22 dias. Está presente em todos os fluidos extracelulares e parece eliminar pequenas proteínas antigênicas solúveis por meio da agregação e do aumento da fagocitose pelo sistema reticuloendotelial. A partir de 18-20 semanas de gestação, a IgG é ativamente transportada pela placenta, fornecendo imunidade humoral para o feto e o neonato antes da maturação do seu sistema imune.

A IgA é encontrada em secreções e atua como uma barreira antisséptica, a qual protege as superfícies das mucosas

A IgA tem uma cadeia H similar à cadeia γ da IgG e suas cadeias α têm 18 aminoácidos extras na região *C* terminal. Essa sequência peptídica extra possibilita a ligação de uma "junção" ou cadeia J. Esse pequeno glicopeptídio ácido (129 resíduos), sintetizado pelos plasmócitos, torna possível a dimerização da IgA secretória. A IgA também é frequentemente encontrada em associação não covalente ao chamado componente secretório, um polipetídio altamente glicosilado com 71 kDa, sintetizado pelas células da mucosa e capazes de proteger a IgA contra digestão proteolítica.

A IgA representa 7-15% das imunoglobulinas do plasma e tem meia-vida de seis dias. É particularmente encontrada na forma dimerizada nas secreções das parótidas, dos brônquios e dos intestinos. É o principal componente do colostro (o primeiro leite materno após o nascimento da criança). Parece que a IgA funciona como barreira imunológica primária contra a invasão das membranas mucosas por patógenos. Pode promover fagocitose, causar degranulação de eosinófilos e ativar o complemento por meio da chamada via alternativa.

A IgM está confinada ao espaço intravascular e auxilia na eliminação de antígenos circulantes e microrganismos

As imunoglobulinas pertencentes a essa última classe principal são polivalentes, com elevada massa molecular. A IgM tem uma forma básica similar à da IgA, com um domínio extra na cadeia H que possibilita a ligação de uma cadeia J, também sendo capaz de polimerização. A IgM costuma circular na forma de um pentâmero, o qual apresenta massa molecular de 971 kDa, ligado por pontes dissulfeto e pela cadeia J (Fig. 4.5).

A IgM representa 5-10% das imunoglobulinas plasmáticas e tem meia-vida de cinco dias. Em virtude da sua natureza polimérica e da alta massa molecular, a maioria das IgM é encontrada confinada ao espaço intravascular, embora possa ser encontrada nas secreções em menor quantidade, normalmente em associação a componentes secretórios. É o primeiro anticorpo a ser sintetizado após um desafio antigênico.

Outras imunoglobulinas

A IgD é o receptor de superfície para antígenos nos linfócitos B

A IgD difere da estrutura padrão das imunoglobulinas, principalmente pelo seu alto conteúdo de carboidratos com inúmeras unidades de oligossacarídios, o que resulta em um aumento da massa molecular com 190 kDa. As cadeias δ são caracterizadas por apresentar apenas uma ponte dissulfeto interconectando-as e uma região de dobradiça alongada que é particularmente suscetível à proteólise.

Representando cerca de 0,5% da quantidade das imunoglobulinas plasmáticas circulantes, a IgD tem função indefinida, embora como um componente da superfície de células B madura provavelmente desempenhe o mesmo papel na resposta aos antígenos. Os raros casos de deficiência isolada de IgD parecem estar associados a alguma patologia não evidente.

A IgE liga antígenos e promove a liberação de aminas vasoativas dos mastócitos

A IgE é similar à IgM em sua unidade estrutural. Tem cadeias pesadas ε que consistem em cinco domínios, em vez de quatro, porém não ocorre ligação com a cadeia J nem formação de polímeros. A cadeia H estendida ajuda a explicar a alta massa molecular da IgE, a qual é de aproximadamente 200 kDa. Está presente em quantidades mínimas no plasma.

A IgE tem elevada afinidade por sítios de ligação em mastócitos e basófilos. A ligação antigênica na região Fab_2 induz a formação de uma ligação cruzada do receptor de alta afinidade, exercendo granulação da célula e liberação de aminas vasoativas. Por meio desse mecanismo, a IgE desempenha importante função na alergia/atopia e medeia a imunidade antiparasitária.

Imunoglobulinas monoclonais são o produto de uma única célula B e surgem a partir de transformações malignas ou benignas de células B

As imunoglobulinas monoclonais resultam da proliferação de um único clone de célula B, o qual produz anticorpos idênticos. Em geral, são moléculas estruturalmente normais, mas às vezes elas podem estar de alguma maneira fragmentadas ou truncadas. Na eletroforese em gel, a imunoglobulina monoclonal forma uma banda única na região γ (a **banda da paraproteína**) (Fig. 4.6).

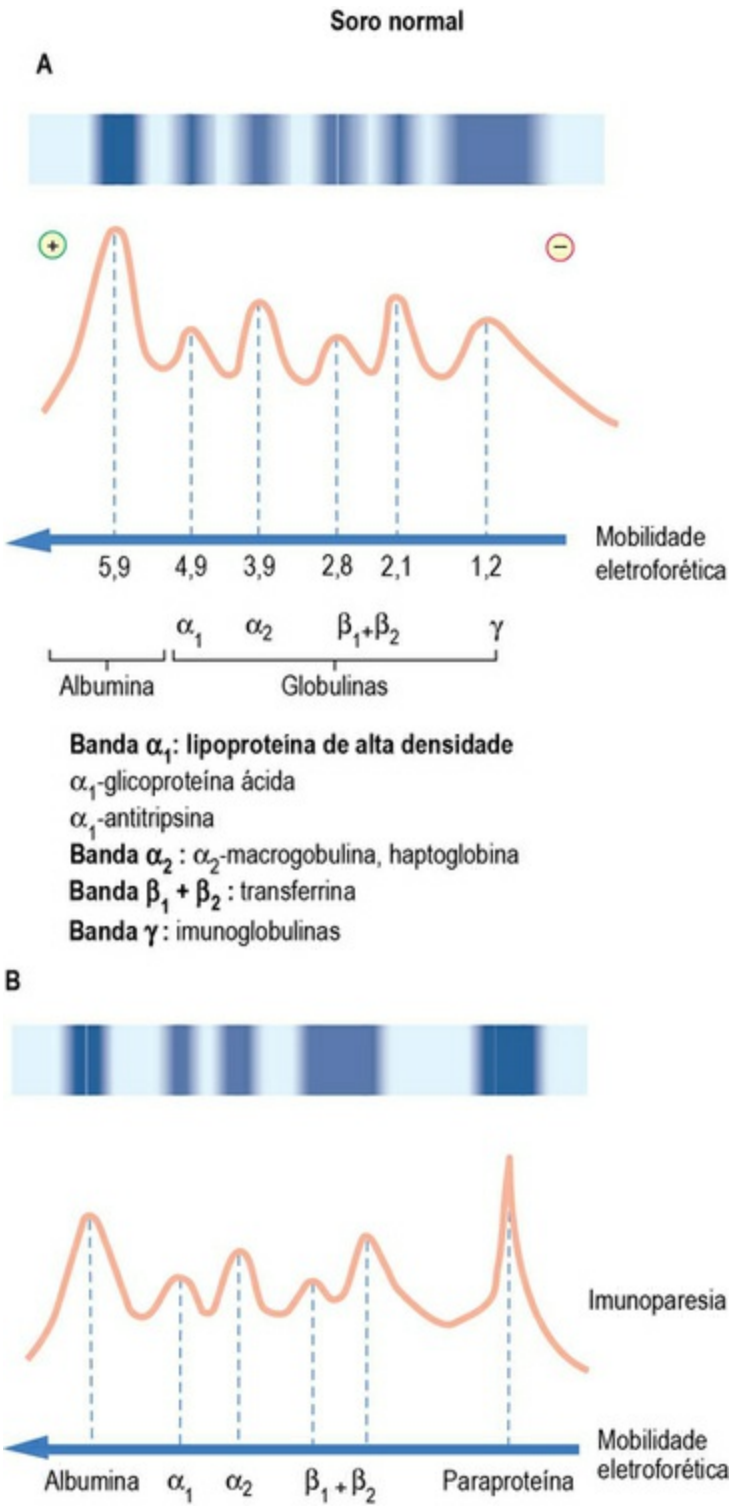


FIG. 4.6 Comparação da aparência eletroforética de um soro normal com a de um soro contendo imunoglobulinas monoclonais.
Os picos do padrão de varredura (linha sólida) representam as concentrações relativas das proteínas separadas. **(A)** Soro normal. **(B)** Gamopatia monoclonal: uma banda intensamente corada está presente na região da γ-globulina na eletroforese e há uma redução associada na coloração do restante da região γ (imunoparesia).

As imunoglobulinas monoclonais estão associadas a patologias malignas, como o **mieloma** e a **macroglobulinemia de Waldenström**, e também a transformações mais benignas que são geralmente denominadas gamopatias monoclonais de significado indeterminado (MGUS).

A resposta de fase aguda e proteína c reativa

A resposta de fase aguda é uma resposta não específica à lesão tecidual ou infecção; ela afeta diversos órgãos e tecidos

Durante a resposta de fase aguda, há um aumento característico marcante da síntese de algumas proteínas (predominantemente no fígado), junto com o decréscimo da concentração de outras no plasma (Fig. 4.7). Um aumento na síntese de proteínas, como os inibidores de proteases (α_1-antitripsina), as proteínas de coagulação (fibrinogênio, protrombina), as proteínas do complemento e a proteína C reativa, proporciona benefício clínico evidente. A síntese de albumina, transtiretina (pré-albumina) e transferrina decresce durante a resposta de fase aguda, sendo chamadas de "reagentes negativos da fase aguda".

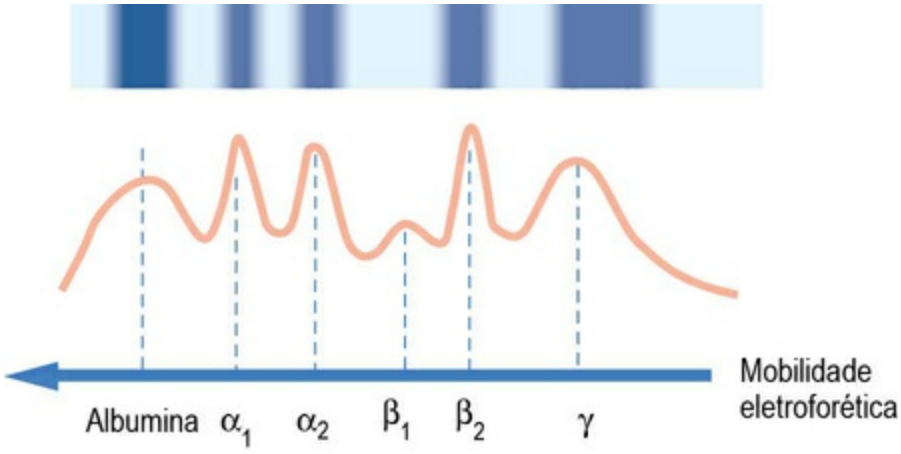


FIG. 4.7 Resposta de fase aguda.
Padrão eletroforético de gel observado no soro durante uma resposta de fase aguda. A albumina está diminuída, a soma das globulinas α_1 e α_2 está aumentada, as β_1-globulinas estão diminuídas, as β_2-globulinas estão aumentadas e há um pequeno aumento das γ-globulinas. Compare este padrão com o padrão normal apresentado na Fig. 4.6A.

A proteína C-reativa (PC-R) é o principal componente da resposta de fase aguda e um marcador de infecção bacteriana

A PC-R é sintetizada no fígado e composta por cinco subunidades polipeptídicas. Tem uma massa molecular de cerca de 130 kDa. Está presente em quantidades ínfimas (<1 mg/L no soro normal), e acredita-se que se ligue a fosfolipídios e a algumas proteínas em microrganismos invasores ou células danificadas, facilitando a ativação do complemento pela via clássica (Cap. 38). A dosagem da concentração de PC-R no plasma é um teste laboratorial essencial no diagnóstico e no monitoramento da infecção e da sepse (Fig. 4.8).

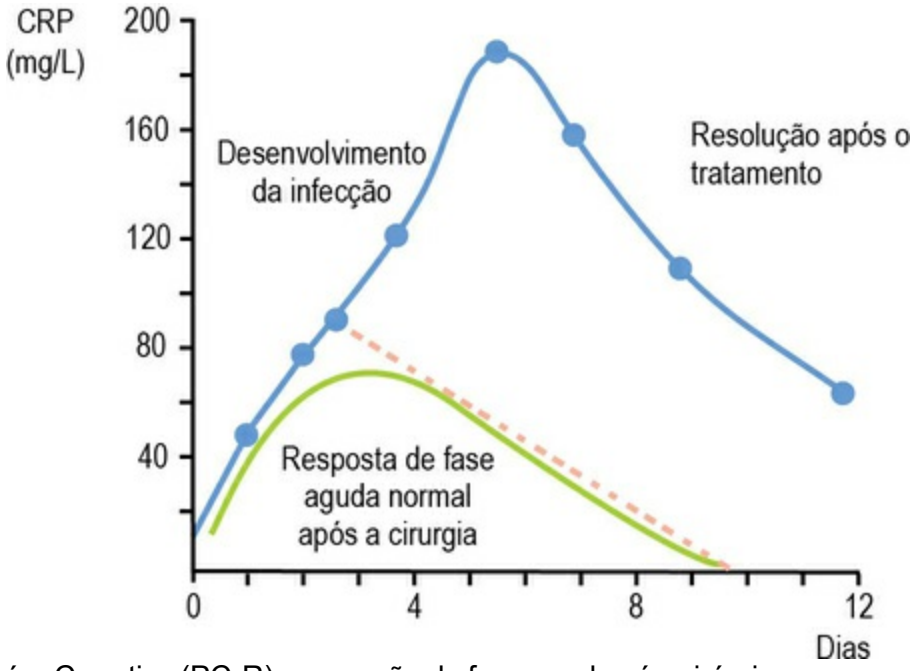


FIG. 4.8 Proteína C-reativa (PC-R) e a reação de fase aguda pós-cirúrgica.
A concentração da PCR aumenta como parte da resposta de fase aguda ao traumatismo cirúrgico, e o posterior aumento deve ser observado quando a recuperação é complicada por uma infecção. (A linha tracejada representa resposta à cirurgia sem complicação.)



Quadro clínico

Um homem com princípio repentino de dor nas costas: mieloma múltiplo

Um homem de 65 anos apresentou repentino princípio de dor nas costas. A radiografia revelou fratura por compressão da segunda vértebra lombar e discretas lesões cranianas focais, chamadas de lesões em saca-bocado. A eletroforese do soro revelou a existência de imunoglobulina monoclonal. Isso provou ser uma imunoglobulina do tipo IgG. Na eletroforese, um excesso de cadeias κ livres **(proteína de Bence-Jones)** também foi encontrado na urina do paciente.

Comentário

O mieloma múltiplo afeta homens e mulheres com igual incidência e surge na maior parte das vezes após os 50 anos. As características clínicas são resultantes da proliferação maligna de plasmócitos monoclonais e da síntese e secreção de anticorpos por essas células. As lesões nos ossos afetam crânio, vértebras, costelas e pelve. Pode haver osteoporose generalizada e fraturas patológicas. Em cerca de 20% dos casos, não é detectada nenhuma proteína plasmática, embora as proteínas Bence-Jones estejam presentes na urina. Tais casos são comumente associados à supressão da produção de outras imunoglobulinas (imunoparesia). O excesso de cadeias leves pode causar falência renal como consequência da deposição de proteínas Bence-Jones nos túbulos renais ou amiloidose. Outras descobertas comuns em mielomatose são anemia e hipercalcemia.

A elevada sensibilidade do ensaio da PC-R é usada na avaliação do risco cardiovascular

Um ensaio para a PC-R, o qual é aproximadamente 100 vezes mais sensível do que o método de dosagem de PC-R convencional, detecta mínimas flutuações na concentração dessa proteína em indivíduos sem infecção. Pequenos aumentos na concentração da PCR parecem refletir o estado de **inflamação crônica de baixo grau**, o qual está associado, por exemplo, ao aumento do risco de doença cardiovascular (Cap. 18). Outras condições inflamatórias, como as doenças inflamatórias do intestino, o diabetes tipo 2 e a síndrome metabólica, têm sido associadas a esses pequenos aumentos na concentração de PC-R no soro.



Quadro clínico

Mulher de 44 anos com edema: síndrome nefrótica

Uma mulher de 44 anos foi atendida em um hospital devido a fraqueza, anorexia, infecções recorrentes, edema bilateral dos membros inferiores e falta de ar. Sua concentração de albumina plasmática era de 19 g/L (faixa normal 36-52 g/L) e sua excreção de proteína na urina era de 10 g/24 h (valor normal 0,15 g/24 h). Apresentava hematúria microscópica. A biopsia renal confirmou o diagnóstico como glomerulonefrite membranoproliferativa.

Comentário

Essa paciente teve a tríade clássica da síndrome nefrótica: hipoalbuminemia, proteinúria e edema. A nefrite causou dano à membrana basal glomerular, o que resultou em perda de albumina. Na síndrome nefrótica, a perda contínua de albumina excede a capacidade sintética do fígado e resulta em hipoalbuminemia; assim, a pressão osmótica capilar é significativamente reduzida. Isso leva tanto a edema periférico (perna) quanto a edema pulmonar (falta de ar). Com o aumento do dano glomerular, as proteínas de maior massa molecular, como as imunoglobulinas e o complemento, são perdidas na urina.



Quadro clínico

Mulher atendida após um acidente rodoviário: resposta de fase aguda

Uma mulher de 45 anos sofreu lesão grave nos membros inferiores em acidente de trânsito. Após sua admissão no hospital, o perfil bioquímico revelou um pequeno decréscimo da concentração total de proteína sérica (58 g/L; normal 60-80 g/L) e albumina sérica (38 g/L; normal 36-52 g/L). A eletroforese do soro indicou aumento nas frações proteicas α_1 e α_2. Quatro dias após a cirurgia, a condição da paciente se deteriorou e ela desenvolveu aumento de temperatura, sudorese e confusão. Foi

diagnosticada uma infecção aguda e o tratamento com antibióticos apropriados foi iniciado. As concentrações de PC-R alcançaram um pico em cinco dias após a cirurgia (Fig. 4.8).

Comentário

O aumento das concentrações de proteínas α_1 e α_2 (como α_1-antitripsina, α_1-glicoproteína ácida e haptoglobina), associado ao decréscimo da concentração de albumina sérica, sugere uma resposta de fase aguda. Essa resposta está também associada ao aumento na PC-R, na velocidade de hemossedimentação (VHS) e na viscosidade do plasma. A resposta do paciente ao tratamento da infecção está associada a um decréscimo na concentração de PCR no plasma.

Testes clínicos: biomarcadores

Os laboratórios clínicos realizam um elevado número de análises bioquímicas nos fluidos corporais para dar respostas a questões clínicas específicas

A maioria dos espécimes recebidos pelo laboratório é de amostras de sangue e de urina. Enquanto algumas dosagens são realizadas no sangue total, prefere-se o soro ou o plasma para a maioria das análises de metabólitos e íons. Em geral, o tempo dedicado à análise de cada amostra é curto, mas o processo global desde o pedido de uma análise até a recepção de um resultado envolve muitas etapas. Ao longo do processo, a verificação constante e o controle de qualidade são executados para garantir que os resultados produzidos são analítica e clinicamente válidos. Um diagrama do fluxo de trabalho no laboratório é apresentado na Figura 4.3.

Os laboratórios clínicos atuais dependem, tal qual os modernos de investigação genética, de instrumentos automatizados de elevada produtividade e de tecnologias robóticas

Um elevado grau de automatização e a tecnologia informática subjacente permitem realizar diversas análises, ao mesmo tempo em que possibilitam testes específicos de hematologia e bioquímica (ver Apêndice 1). É a logística do transporte do espécime para o laboratório, e não a análise propriamente dita, que em muitos casos se torna no fator limitante do fluxo de trabalho.

Descobrindo novos biomarcadores

Um biomarcador é um indicador de estado biológico ou uma característica dosada como um indicador de um processo normal ou patológico

Tal marcador pode ser usado para triagem e avaliação de risco, diagnóstico e detecção de condições clínicas, ou para o monitoramento do tratamento e de seus efeitos secundários. O processo de descoberta de novos biomarcadores é conduzido agora pela aplicação das chamadas tecnologias "ômicas": genômica, transcriptômica, proteômica e

metabolômica (Cap. 36). As amostras de sangue e de urina continuam a ser os materiais mais importantes para a descoberta de biomarcadores.

A metabolômica explora padrões de pequenas moléculas

A metabolômica é o estudo de todos os metabólitos produzidos no organismo, inclusive os de fármacos, compostos derivados de alimentos e substâncias produzidas pela flora microbiana

A Human Metabolome Database (versão 2.5) contém cerca de 7.900 metabólitos. A exploração de metabólitos é um processo localizado a jusante da genômica e da transcriptômica — o estudo dos genes e de sua expressão, respectivamente (Cap. 36). As metodologias da metabolômica possibilitam a exploração de vias inteiras, produzindo padrões de concentrações de metabólitos. Assim, elas fornecem uma imagem dinâmica do padrão de metabólitos inteiro em uma dada condição. A desvantagem de uma imagem tão complexa é que ela pode ser confundida com compostos resultantes de alimentos ingeridos ou com metabólitos de fármacos e outras substâncias exógenas (xenobióticos).

O processo-chave é a comparação de tais padrões entre as populações afetadas e de referência, usando técnicas como a espectrometria de massas combinada com a cromatografia gasosa (GC-MS) ou a cromatografia líquida (LC-MS). Os metabólitos individuais podem ser subsequentemente identificados usando ressonância magnética nuclear (RMN).

A validação dos potenciais marcadores requer estudos em grandes coortes de indivíduos não afetados e afetados. Normalmente, os tamanhos populacionais necessários excedem as capacidades de um único estudo. Como tal, a **metanálise** (comparação de diferentes estudos) é extensivamente utilizada. Tal metanálise pode ser simplesmente uma comparação de vários estudos publicados ou pode envolver uma análise combinada de grupos de dados provenientes de diferentes estudos, ou — o método mais trabalhoso, mas também o mais confiável — pode consistir na análise dos dados de participantes individuais de diferentes estudos combinados em um "novo" grupo muito grande.

Resumo

- Os elementos figurados do sangue são os eritrócitos, os leucócitos e as plaquetas. Eles estão suspensos em uma solução aquosa (plasma) e têm várias funções especializadas, como o transporte de oxigênio, a destruição de agentes externos e a coagulação do sangue. Quando o sangue entra no processo de coagulação, obtemos o soro. Os testes bioquímicos, em sua maioria, são feitos no soro. Para obter o plasma, o sangue deve ser colocado em um tubo contendo anticoagulante.
- O plasma contém muitas proteínas classificadas, de modo geral, em albumina e globulinas (predominantemente imunoglobulinas). A albumina funciona como um determinante da pressão osmótica e o principal transportador proteico para metais-

traço (em baixa quantidade), hormônios, bilirrubina e ácidos graxos livres.

- Outras proteínas de ligação unem-se a ligantes específicos, como a ceruloplasmina se liga ao Cu^{2+} e a globulina ligadora de tiroxina (TBG) associa aos hormônios da tireoide.
- As imunoglobulinas participam da defesa do organismo contra antígenos que podem penetrar ou tentar penetrar no corpo. Elas têm estruturas em comum e existem cinco classes de imunoglobulinas com diferentes funções protetoras.
- Alterações nas concentrações das proteínas plasmáticas fornecem informações clínicas importantes. O padrão característico constituído por decréscimo de albumina, transtiretina e transferrina e aumento de α_1-antitripsina, fibrinogênio e proteína C reativa indica uma resposta de fase aguda.
- A eletroforese das proteínas do soro e da urina é um importante método para identificar a presença de imunoglobulinas monoclonais.

Questões para aprendizagem

1. Compare e contraste o plasma e o soro e discuta a diferença entre os tipos de amostras sanguíneas retiradas para testes laboratoriais.
2. Discuta a função do transporte da albumina sérica.
3. Descreva a estrutura básica das imunoglobulinas e as diferentes funções exercidas na imunidade por suas diferentes classes.
4. Como a reação de fase aguda afeta o resultado de testes sanguíneos?
5. Caracterize a doença de Wilson.
6. O que acontece com a hemoglobina quando os eritrócitos se rompem?

Leituras sugeridas

Abu Aboud, O., Weiss, R. H. New opportunities from the cancer metabolome. *Clin Chem*. 2013; 59:138–146.

Anderson, N. L. The clinical plasma proteome: a survey of clinical assays for proteins in plasma and serum. *Clin Chem*. 2010; 56:177–185.

El-Youssef, M. Wilson's disease. *Mayo Clin Proc*. 2003; 78:1126–1136.

Gilstrap, L. G., Wang, T. J. Biomarkers and cardiovascular risk assessment for primary prevention: an update. *Clin Chem*. 2012; 58:72–82.

Nature Outlook. Multiple myeloma. *Nature*. 2011; 480:833–858.

Pavlou, M. P., Diamandis, E. P., Blasutig, I. M. The long journey of cancer biomarkers from the bench to the clinic. *Clin Chem*. 2013; 59:147–157.

Suhre, K., Shin, S.-Y., Petersen, A.-K., et al. Human metabolic individuality in biomedical and pharmaceutical research. *Nature*. 2011; 477:54–60.

Zimmermann, M. A., Selzman, C. H., Cothren, C. Diagnostic implications of C-reactive protein. *Arch Surg*. 2003; 138:220–224.

Sites

Biomarkers: www.niehs.nih.gov/health/topics/science/biomarkers/index.cfm

National Cancer Institute, NCI NIH. NCI Dictionary of Cancer Terms. www.cancer.gov/dictionary?cdrid=45618

CAPÍTULO 5

Transporte de Oxigênio

Norma Frizzell and George M. Helmkamp, Jr.

Objetivos

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever o mecanismo de ligação do oxigênio à mioglobina e à hemoglobina.
- Descrever as diferenças conformacionais entre as hemoglobinas oxigenadas e desoxigenadas.
- Definir o conceito de cooperatividade na ligação do oxigênio à hemoglobina.
- Descrever o efeito Bohr e seu papel na modulação da ligação do oxigênio à hemoglobina.
- Explicar como o 2,3-bifosfoglicerato interage com a hemoglobina e influencia a ligação do oxigênio.
- Resumir o processo pelo qual o dióxido de carbono é transportado dos tecidos periféricos aos pulmões.
- Descrever as classificações principais das hemoglobinopatias.
- Descrever as bases moleculares da anemia falciforme.

Introdução

Os vertebrados são organismos aeróbicos

Eles têm um sistema circulatório fechado e um mecanismo para extração de O_2 do ar (ou da água) e liberação de dióxido de carbono (CO_2) como produto residual. O oxigênio inspirado leva a uma utilização eficiente dos combustíveis metabólicos, como a glicose e os ácidos graxos; o CO_2 expirado é o produto principal do metabolismo celular. Essa utilização do O_2 como um substrato metabólico é acompanhada pela geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) que são capazes de danificar teoricamente todas as

macromoléculas biológicas (Cap. 37). Os organismos se protegem do dano pelos radicais livres de várias maneiras: sequestrando O_2, limitando a produção de ROS e desintoxicando-se. As **hemeproteínas**, de modo interessante, participam desses mecanismos protetores sequestrando e transportando oxigênio. As principais hemeproteínas em mamíferos são a mioglobina (Mb) e a hemoglobina (Hb). A Mb é encontrada principalmente nos músculos estriado e esquelético e serve para armazenar O_2 no citoplasma e liberá-lo sob demanda para a mitocôndria. A Hb está restrita aos eritrócitos, nos quais facilita o transporte de O_2 e CO_2 entre os pulmões e os tecidos periféricos. Este capítulo apresenta as características moleculares da Mb e da Hb, as relações bioquímicas e fisiológicas entre as estruturas da Mb e da Hb, suas interações com o O_2 e outras pequenas moléculas e os aspectos patológicos de mutações selecionadas da Hb.

Propriedades do oxigênio

A maior parte do oxigênio encontrado no corpo está ligada a uma proteína transportadora contendo o grupo heme

Os organismos fotossintéticos liberam oxigênio diatômico na atmosfera terrestre durante a produção de energia, contribuindo para o atual nível de 21% de oxigênio no ar. Em misturas de gases, cada componente faz uma contribuição específica, conhecida como pressão parcial (Lei de Dalton), que é diretamente proporcional à concentração dos gases. Costuma-se usar a pressão parcial de um gás como medida de sua concentração em fluidos biológicos. Para o O_2 atmosférico em pressão barométrica (nível do mar) de 760 mmHg ou torr (101,3 kP ou kPa; 1 atmosfera absoluta ou ATA), a pressão parcial de oxigênio, pO_2, é 150-160 mmHg. A quantidade de O_2 em solução é, por sua vez, diretamente proporcional à sua pressão parcial. Assim, no sangue arterial (37°C, pH 7,4), a pO_2 é ~100 mmHg, a qual produz uma concentração de O_2 dissolvido de 0,13 mmol/L. Esse nível de O_2 dissolvido, entretanto, é inadequado para garantir um metabolismo aeróbico eficiente.

A maior fração de O_2 transportada no sangue e armazenada nos músculos está complexada com o ferro (ferroso, Fe^{2+}) nas proteínas Hb e Mb, respectivamente. A Hb é uma proteína tetramérica com quatro sítios de ligação ao O_2 (grupos heme). No sangue arterial com concentração de Hb de 150 g/L (2,3 mmol/L) e saturação de O_2 de 97,4%, a contribuição de O_2 ligado à proteína é de cerca de 8,7 mmol/L. Essa concentração representa um imenso aumento de 67 vezes sobre o O_2 fisicamente dissolvido. A capacidade total de carreamento de oxigênio do sangue arterial, nas formas dissolvida e ligada à proteína, é ~8,8 mmol/L — quase 200 mL de oxigênio dissolvido por litro de sangue.

Características das proteínas globinas de mamíferos

As globinas constituem uma família antiga de metaloproteínas

As globinas são uma família ubíqua de proteínas, encontrada em microrganismos, plantas, invertebrados e vertebrados. As globinas atuais, com suas diversidades espetaculares de função, provavelmente evoluíram de uma única globina ancestral. Enquanto a dimensão da identidade de aminoácidos entre globinas de invertebrados e de vertebrados varia bastante e pode parecer frequentemente aleatória, duas características são dignas de atenção: os resíduos invariantes PheCD1 e HisF8 e os padrões característicos dos resíduos hidrofóbicos nos segmentos helicoidais (Fig. 5.1). A Mb humana consiste em um único polipeptídio globina (153 resíduos de aminoácidos, 17.053 Da). A Hb humana é uma molécula tetramérica de dois polipeptídios α-globina (141 resíduos, 15.868 Da) e dois polipeptídios β-globina (146 resíduos, 15.126 Da). Um único grupo prostético heme está associado não covalentemente a cada apoproteína globina.

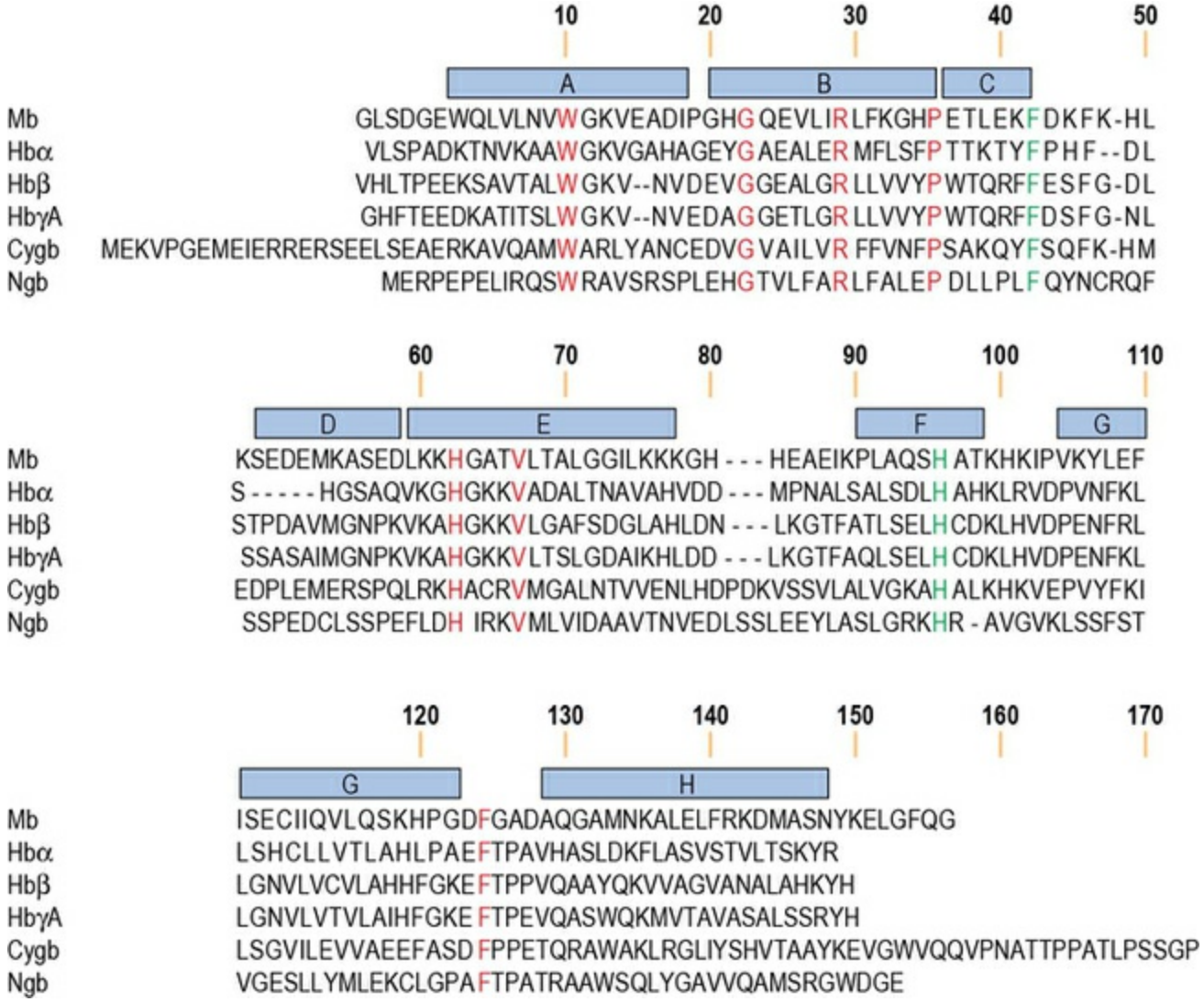


FIG. 5.1 As sequências de aminoácidos das globinas humanas são altamente conservadas. Está representado um alinhamento das globinas humanas, com os resíduos de aminoácidos idênticos em laranja. Os dois resíduos em verde, PheCD1 (F) e HisF8 (H), são absolutamente conservados em todas as globinas metazoárias. Os segmentos helicoidais na mioglobina estão identificados pelas barras azuis. Mb, mioglobina; Hbα, α-globina; Hbβ, β-globina; HbγA, γA-globina; Cygb, citoglobina; Ngb, neuroglobina.

A estrutura secundária das globinas de mamíferos é dominada por uma alta proporção de α-hélice, com mais de 75% dos aminoácidos associados a oito segmentos helicoidais. Essas α-hélices estão organizadas em uma estrutura terciária altamente "empacotada" e quase esférica, designada dobras de globina (Fig. 5.2). Essa estrutura terciária é tão universal entre todas as globinas que a nomenclatura convencional para os resíduos de globina segue a inicialmente definida para a Mb de cachalote, denominadas hélices A, B, C etc., começando na extremidade *N*-terminal, separadas pelos cantos AB, BC etc., com os resíduos numerados dentro de cada hélice e no canto. Por exemplo, o resíduo A14, um aminoácido que participa da estabilização eletrostática entre a hélice A e o canto GH, corresponde a Lys^{15} na Hb de inseto; a Lys^{16} na Mb e na α-globina; e Lys^{17} na β-globina (seta, abaixo ao centro, Fig. 5.2).

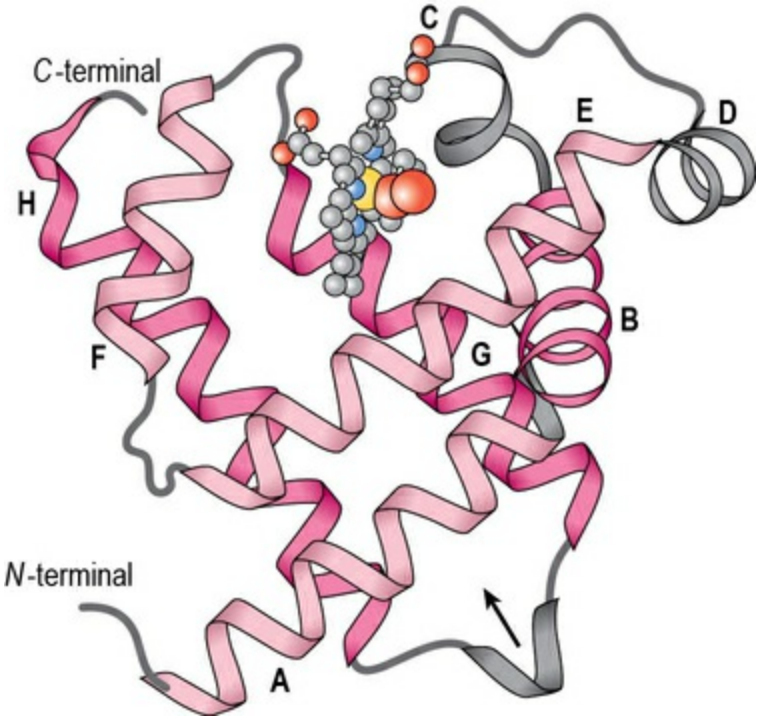


FIG. 5.2 A mioglobina é uma proteína globular compacta. Nessa ilustração da mioglobina de mamífero, apenas a estrutura do polipeptídio globina é mostrada, com ênfase na alta proporção de estrutura secundária (exclusivamente α-hélice). O arranjo de duas camadas, de três em três α-hélices, está destacado pelas tonalidades de vermelho-claro e escuro. O grupo heme está ilustrado como uma estrutura "bola e bastão" cinzenta, com o ferro (amarelo) e uma molécula de oxigênio ligada (vermelho).

Os aminoácidos polares estão localizados quase exclusivamente na superfície exterior dos polipeptídios globina e contribuem para a alta solubilidade dessas proteínas (p. ex., 370 g/L (solução proteica a 37%; 5,7 mmol/L) de Hb no eritrócito). Os aminoácidos que são tanto polares quanto hidrofóbicos, como a treonina, a tirosina e o triptofano, estão orientados com seus grupos funcionais na direção do exterior da proteína. Os resíduos hidrofóbicos estão voltados para o interior, onde eles estabilizam a dobradura do polipeptídio e formam uma bolsa que acomoda o grupo prostético heme. Exceções notáveis a essa distribuição geral de resíduos de aminoácidos nas globinas são as duas histidinas que têm papéis indispensáveis dentro da bolsa do heme (Fig. 5.3). As cadeias

laterais dessas histidinas estão orientadas perpendicularmente e de cada lado do grupo prostético heme. Um dos nitrogênios do grupo imidazol da cadeia lateral da histidina proximal não variável (HisF8) está próximo o suficiente para ligar-se diretamente ao átomo de Fe^{2+} pentacoordenado. No lado oposto do plano do heme, a histidina distal (HisE7), a qual está muito longe do ferro do heme para a ligação direta, funciona para estabilizar o O_2 ligado por ponte de hidrogênio.

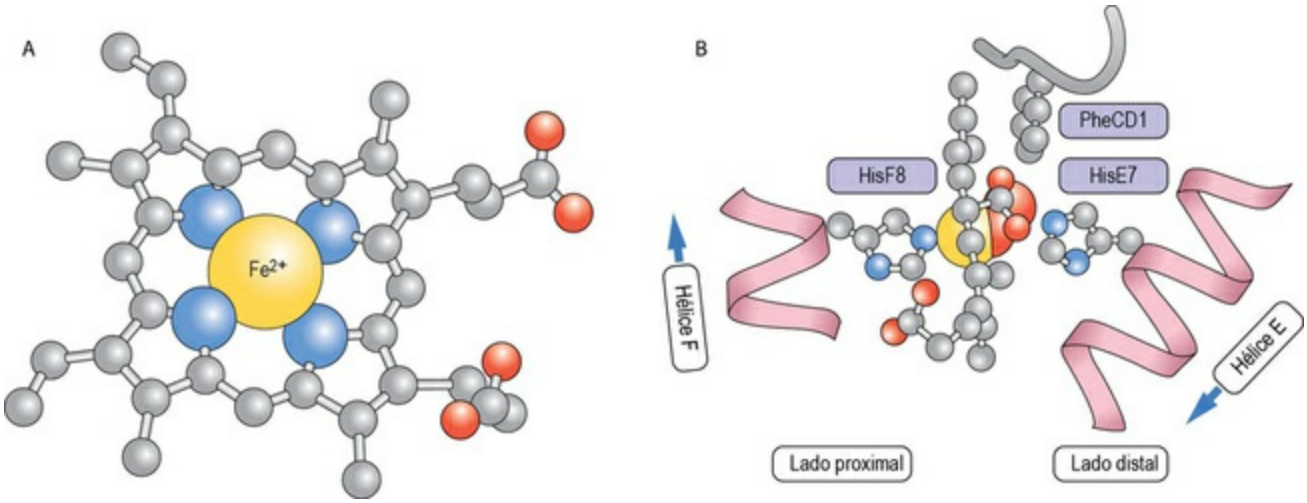


FIG. 5.3 O heme é um complexo de porfirina e ferro. **(A)** Nessa figura, a estrutura de carbono da protoporfirina IX, um anel tetrapirrol conjugado, é mostrado em cinza; as moléculas de O_2 estão em vermelho. O ferro (esfera amarela) prefere seis ligantes em uma geometria de coordenação octaédrica; os átomos de nitrogênio pirrólicos (esferas azuis) fornecem quatro deles. A PheCD1 faz interações hidrofóbicas e eletrostáticas empilhadas fundamentais com o anel porfirínico. **(B)** Na estrutura da globina oxigenada, o heme planar está posicionado entre as histidinas proximal e distal (HisF8 e HisE7, respectivamente); apenas a HisF8 tem um nitrogênio imidazólico (esfera azul) próximo o suficiente para ligar ao ferro. As α-hélices que contêm essas histidinas são mostradas em rosa. Nas globinas desoxigenadas, a sexta posição permanece livre, deixando um ferro pentacoordenado. No estado oxigenado, o O_2 ocupa a sexta posição. Os dois grupos propionato da porfirina participam das interações eletrostáticas e por ponte de hidrogênio com as cadeias laterais da globina e o solvente.

Estrutura do grupo prostético heme

O heme, a porção de ligação ao O_2 comum à Mb e à Hb, é uma molécula porfirínica à qual um átomo de ferro (Fe^{2+}) está coordenado

O grupo prostético heme Fe-porfirina é planar e hidrofóbico, com exceção de dois grupos propionato que estão expostos ao solvente. O heme se torna um componente integral da holoproteína durante a síntese do polipeptídio; é o grupo heme que dá às globinas suas características de cor vermelho-púrpura — púrpura no estado desoxigenado no sangue venoso, vermelho no estado oxigenado no sangue arterial.

As globinas aumentam a solubilidade em água do grupo prostético heme de uma forma pouco solúvel, hidrofóbica. Uma vez sequestrado dentro de uma bolsa hidrofóbica criada pelo peptídio de globina empacotado, o heme está em um ambiente protetor que minimiza a oxidação espontânea do Fe^{2+} (ferroso) a Fe^{3+} (férrico: enferrujando) na

presença de O_2. Tal ambiente é também essencial para as globinas ligarem-se e liberarem O_2. Se o átomo de ferro se tornasse oxidado ao estado férrico, o heme não poderia mais interagir reversivelmente com o O_2, comprometendo sua função no armazenamento e no transporte de O_2.

Mioglobina: uma proteína de armazenamento de oxigênio

A Mb liga o O_2 que foi liberado pela Hb nos capilares teciduais e subsequentemente difundido nos tecidos

Localizada no citosol das células musculares esqueléticas, cardíacas e de algumas células do músculo liso, a Mb armazena uma quantidade de O_2 que está prontamente disponível para as organelas celulares, particularmente a mitocôndria, que realiza o metabolismo oxidativo. Com seu único sítio de ligação conectado ao ligante, a reação reversível da Mb com o O_2:

$$Mb + O_2 \rightleftharpoons Mb \cdot O_2$$

pode ser descrita pelas equações seguintes:

$$K_a = [Mb \cdot O_2] / [Mb][O_2]$$
$$Y = [Mb \cdot O_2] / \{[Mb \cdot O_2] + [Mb]\}$$

em que K_a é a constante de afinidade ou de equilíbrio e Y é a saturação fracional de O_2. Combinando essas duas equações, expressando a concentração de O_2 em termos de sua pressão parcial (pO_2) e substituindo o termo P_{50} por $1/Ka$, gera-se a equação para a curva de saturação por O_2 da Mb:

$$Y = pO_2 / \{pO_2 + P_{50}\}$$

Por definição, a constante P_{50} é o valor de pO_2 no qual $Y = 0{,}5$ ou metade dos sítios ligantes está ocupada pelo O_2. Em um gráfico de Y contra pO_2, a equação para a ligação do ligante na Mb descreve uma hipérbole (Fig. 5.4) com uma P_{50} de 4 mmHg. O baixo

valor de P_{50} reflete alta afinidade pelo O_2. Nos leitos capilares dos tecidos musculares, os valores de pO_2 estão na faixa de 20-40 mmHg. Evidentemente, os músculos em exercício exibem menores valores de pO_2 do que os músculos em repouso. Com essa alta afinidade pelo O_2, a Mb do miócito torna-se prontamente saturada com o O_2 que chegou do sangue. Como o O_2 é consumido durante o metabolismo aeróbico, o O_2 dissocia-se da Mb por ação das massas e difunde-se na mitocôndria, a estação de força da célula muscular. As baleias e outros mamíferos aquáticos têm concentrações anormalmente elevadas de Mb em seu tecido muscular. Acredita-se que a Mb funcione como um grande reservatório de oxigênio para os períodos prolongados debaixo da água.

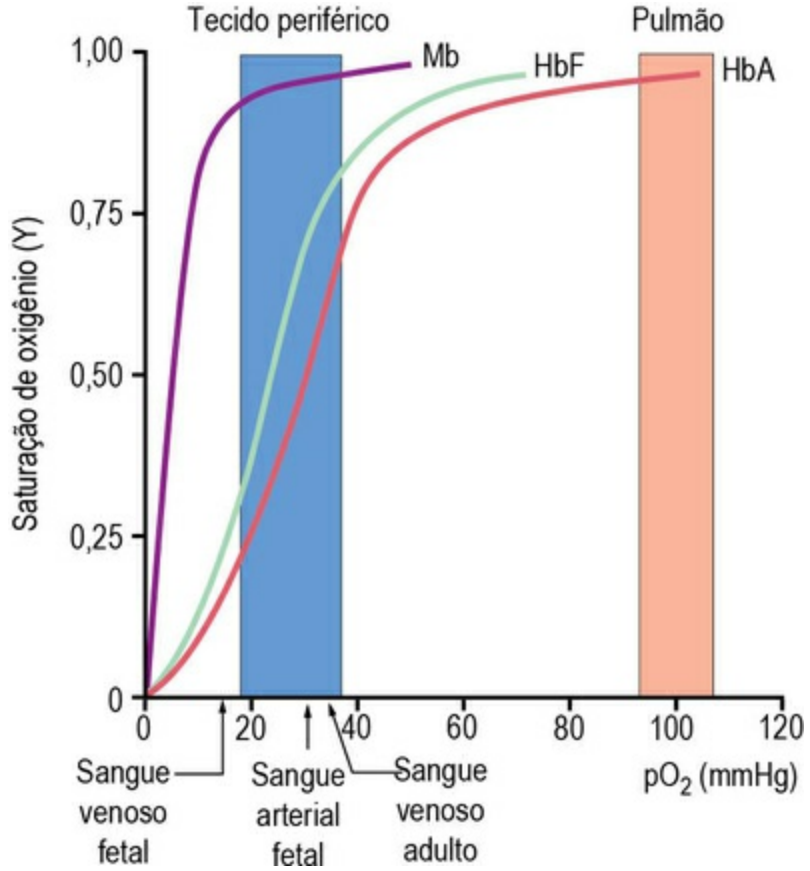


FIG. 5.4 As curvas de saturação da mioglobina e da hemoglobina.
Mb e Hb têm diferentes curvas de saturação. A saturação fracional (*Y*) dos sítios de ligação ao O_2 está representada contra a concentração de O_2 (pO_2 (mmHg)). Curvas são mostradas para a Mb, a Hb fetal (HbF) e a Hb de adulto (HbA). Também estão indicados por setas e sombreamentos os níveis normais de O_2 medidos em várias amostras de sangue de adultos e fetos.

Hemoglobina: uma proteína transportadora de oxigênio

A Hb é a principal proteína transportadora de O_2 no sangue humano; ela está localizada exclusivamente nos eritrócitos

A Hb adulta (HbA) é um arranjo tetraédrico de duas subunidades de α-globinas idênticas e duas β-globinas idênticas, uma geometria que possibilita vários tipos de

interações subunidade-subunidade na estrutura quaternária (Fig. 5.5). O importante é que, dentro da Hb tetraédrica, cada subunidade está em contato com as outras três. A análise experimental da estrutura quaternária indica várias interações não covalentes (pontes de hidrogênio e interações eletrostáticas) entre cada par de subunidades não similares, ou seja, nas interfaces α-β. Por outro lado, existem menos interações, e predominantemente hidrofóbicas, entre subunidades idênticas nas interfaces α_1-α_2 ou β_1-β_2. O número real e a natureza dos contatos diferem-se na presença ou na ausência de O_2. As associações fortes em cada heterodímero $\alpha\beta$ e a interface entre os dois heterodímeros (Fig. 5.5) são agora reconhecidas como os principais fatores que determinam a ligação e a liberação de O_2. Portanto, a Hb é considerada mais apropriadamente como um dímero de heterodímeros, $(\alpha\beta)_2$, do que como um tetrâmero $\alpha_2\beta_2$. Embora uma solução de HbA seja teoricamente uma mistura dinâmica de heterodímeros e tetrâmeros, sob condições fisiológicas (alta Hb e pH neutro) o equilíbrio favorece bastante o tetrâmero: 99% para a Hb oxigenada e 99,9% para a Hb desoxigenada.

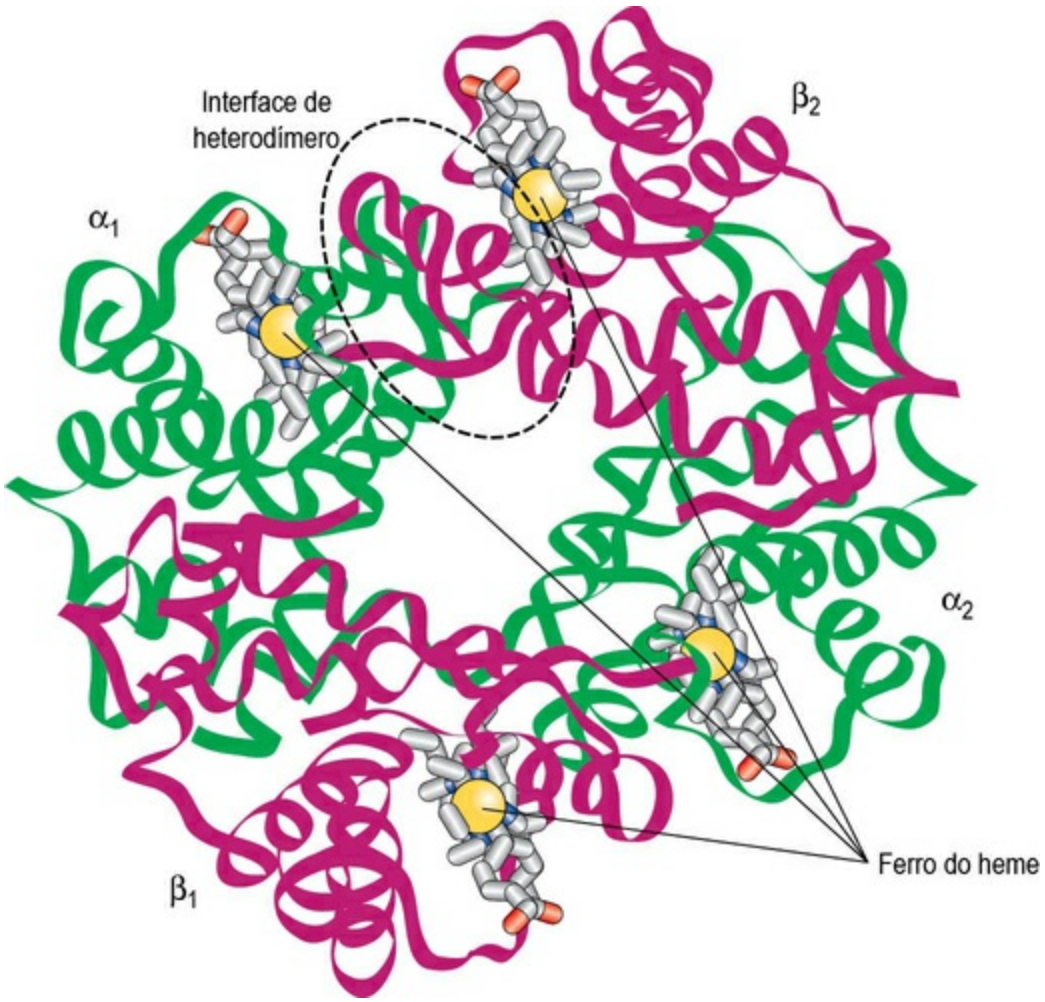


FIG. 5.5 A hemoglobina é um tetrâmero de quatro subunidades de globina. A Hb é um complexo tetraédrico de duas α-globinas idênticas (α_1 e α_2, em verde) e duas β-globinas idênticas (β_1 e β_2, em vermelho). Com essa geometria, cada subunidade de globina faz contato com outras três subunidades, criando as interfaces e interações que definem cooperatividade. Uma dessas interfaces de heterodímero está contornada por um tracejado oval.

Quadro clínico

Terapia hiperbárica de o_2 para o envenenamento agudo por monóxido de carbono

Uma gestante de 22 anos, com um feto de 31 semanas, foi levada à maternidade de um hospital com suspeita de envenenamento por CO. A paciente apresentava dor de cabeça, náuseas e anormalidades visuais. Ela declarou que seu local de trabalho tinha sofrido reparos nos sistemas de aquecimento e ventilação durante as duas últimas semanas e que, no dia de sua visita ao hospital, o corpo de bombeiros havia evacuado o prédio após detectar alto nível de CO (200 ppm), contrapondo-se a um nível urbano típico de 10 ppm. A pressão sanguínea era de 116/68 mmHg, pulsação de 100 e velocidade respiratória de 24/min. Na avaliação da paciente, foi notório um conteúdo de carboxi-hemoglobina (COHb) de 15% da Hb total no momento da admissão (normal = 3%, mas pode exceder 10% em fumantes pesados). O monitoramento fetal indicava frequência cardíaca de 135, com irregularidades ocasionais e moderadas. As contrações uterinas estavam ocorrendo a cada 3-5 min.

A paciente foi tratada na câmara de O_2 hiperbárica do hospital: 30 min em 2,5 ATA, seguidos de 60 min em 2,0 ATA. Ela também recebeu sulfato de magnésio intravenoso para resolver as contrações prematuras. A paciente foi liberada dois dias depois. Ela deu à luz uma menina saudável com 38 semanas de idade gestacional e que, no exame ao nascimento e com seis semanas de idade, não exibia sequelas aparentes da sua exposição *in utero* ao CO e a 100% de O_2.

Comentário

O monóxido de carbono é um produto normal do catabolismo do heme e tem uma série de atividades fisiológicas nos sistemas vascular, neuronal e imunológico. Como o O_2, o CO liga-se aos grupos prostéticos heme. Como a afinidade do heme ligado à globina para o CO é cerca de 250 vezes aquela para o O_2, a exposição prolongada da hemoglobina ao CO exógeno seria praticamente irreversível ($t_{1/2}$ para a reversão no sangue, 4-8 horas) e levaria a níveis altamente tóxicos de carboxi-Hb. O O_2 hiperbárico é o tratamento de escolha para o envenenamento por CO grave ou complicado.

A administração de O_2 100% em 2-3 ATA cria valores de pO_2 arterial e tecidual de 2.000 mmHg e 400 mmHg, respectivamente (20 vezes o normal). O resultado imediato é uma redução na $t_{1/2}$ da carbóxi-Hb para menos de 30 min. O O_2 hiperbárico é também utilizado no tratamento de doença de descompressão, embolia gasosa arterial, lesão tecidual induzida por radiação ou isquêmica e hemorragia grave.

Interações da hemoglobina com o oxigênio

A Hb liga-se ao oxigênio cooperativamente, com um coeficiente de Hill de ~2,7

Como um veículo de liberação de gás, a Hb precisa ser capaz de ligar O_2 eficientemente quando entra no alvéolo pulmonar durante a respiração e de liberar O_2 para o ambiente extracelular com eficiência similar ou quando o eritrócito circula pelos capilares teciduais. Essa dualidade de função excepcional é alcançada pelas interações cooperativas entre as subunidades globinas. Quando a Hb desoxigenada se torna oxigenada, alterações estruturais significantes se estendem por toda a molécula da proteína. Na bolsa do heme, como consequência da coordenação do O_2 com o ferro e uma nova orientação dos átomos na estrutura do heme, a histidina proximal e a hélice F à qual ela pertence mudam suas posições (Fig. 5.3). Essa mudança conformacional sutil desencadeia realinhamentos estruturais maiores em outros lugares na subunidade globina. Em sequência, essas alterações estruturais terciárias são transmitidas, até amplificadas, na estrutura quaternária como um todo, de tal modo que ocorre uma rotação de 12-15° e um deslocamento de 0,10 nm do dímero $\alpha_1\beta_1$ em relação ao dímero $\alpha_2\beta_2$. Devido à assimetria inerente do tetrâmero $\alpha_2\beta_2$, esses movimentos combinados resultam em alterações bem drásticas dentre e principalmente entre os heterodímeros $\alpha\beta$. Devido às alterações estruturais na hemoglobina, como resultado da ligação de oxigênio e outros efetores, a afinidade de ligação para as moléculas subsequentes de oxigênio pode ser aumentada (cooperatividade positiva) ou diminuída (cooperatividade negativa).

A Hb pode ligar até quatro moléculas de O_2 de maneira cooperativa

Com seus vários sítios de ligação conectados ao ligante e alterações estruturais em resposta à ligação, a afinidade pelo oxigênio e a saturação fracional da Hb são funções mais complexas do que aquelas da Mb. Consequentemente, a equação para a curva de saturação pelo O_2 fracional deve ser modificada para:

$$Y = pO_2{}^n / \{pO_2{}^n + P_{50}{}^n\}$$

em que n é o coeficiente de Hill. Em um gráfico de Y contra pO_2 quando n >1, a equação para a ligação do ligante descreve uma curva sigmoide (em forma de S) (Fig. 5.4). O coeficiente de Hill, determinado experimentalmente, é uma medida de cooperatividade entre sítios de ligação do ligante, ou seja, a extensão na qual a ligação de O_2 com uma subunidade influencia a afinidade do O_2 com outras subunidades. Para a ligação cooperativa completa, n é igual ao número de sítios (quatro em Hb), uma indicação de que a ligação a um sítio aumenta ao máximo a ligação a outros sítios na mesma molécula. O coeficiente de Hill normal para a Hb de adulto (n = 2,7) reflete bem a cooperatividade de ligação. A Hb tem afinidade consideravelmente menor pelo O_2, refletida em uma P_{50} de 27 ± 2 mmHg, comparada com a mioglobina (P_{50} = 4 mmHg). Na ausência de cooperatividade, mesmo com vários múltiplos sítios, o coeficiente de Hill seria 1, ou seja,

a ligação de uma molécula de O_2 não influenciaria a ligação de outras moléculas. A cooperatividade diminuída ou ausente é observada em Hb mutantes que perderam os contatos subunidade-subunidade funcionais (Tabela 5.1). O aclive da curva de saturação da Hb ocorre em uma faixa de pO_2 que é encontrada na maioria dos tecidos (Fig. 5.4). Portanto, alterações relativamente pequenas na pO_2 resultarão em alterações consideravelmente maiores na interação da Hb com o O_2. Da mesma maneira, deslocamentos sutis da curva para qualquer direção influenciarão bastante a afinidade pelo O_2.

Tabela 5.1

Classificação e exemplos de hemoglobinopatias

Classificação	Nome comum	Mutação	Frequência	Alterações bioquímicas	Consequências clínicas
Solubilidade anormal	HbC	$Glu^{6(\beta)} \rightarrow Lys$	Comum	Cristalização celular da proteína oxigenada; fragilidade aumentada	Anemia hemolítica moderada; esplenomegalia (baço aumentado)
Afinidade pelo O_2 diminuída	Hb Titusville	$Asp^{94(\alpha)} \rightarrow Asn$	Muito rara	Interface do heterodímero alterada para estabilizar o estado T; cooperatividade diminuída	Cianose discreta (coloração da pele azul-púrpura pelo sangue desoxigenado)
Afinidade pelo O_2 aumentada	Hb Helsinki	$Lys^{82(\beta)} \rightarrow Met$	Muito rara	Ligação do 2,3-BPG diminuída no estado T	Policitemia moderada (aumento na contagem de eritrócitos)
Heme férrico (meta-hemoglobina)	HbM Boston	$His^{58(\alpha)} \rightarrow Tyr$	Ocasional	Bolsa do heme alterada (mutação na His distal)	Cianose da pele e membranas mucosas; efeito Bohr diminuído
Proteína instável	Hb Gun Hill	Δβ91-95	Muito rara	Perda do enovelamento causada pela perda da Leu na bolsa do heme e hélice encurtada	Formação de corpos de Heinz (inclusões de Hb desnaturada); icterícia (coloração amarelada da pele e da esclera); urina pigmentada
Síntese anormal	Hb Constant Spring	$ter^{142(\alpha)} \rightarrow Gln$	muito rara	Perda do códon de terminação; estabilidade do mRNA diminuída	α-talassemia (anemia hemolítica, esplenomegalia e icterícia)

As hemoglobinopatias costumam ser classificadas de acordo com a alteração mais proeminente na estrutura, na função ou na regulação da proteína. A identificação inicial de uma mutação frequentemente envolve a análise eletroforética ou cromatográfica, conforme mostrado na Figura 5.9 para a HbSC, um genótipo duplo heterozigoto associado a um fenótipo de uma doença semelhante à anemia falciforme. Δ = mutante por deleção.

As subunidades da hemoglobina podem assumir duas conformações diferentes, que se diferem na afinidade pelo oxigênio

O mecanismo que fundamenta a cooperatividade na ligação do oxigênio pela hemoglobina envolve uma mudança entre dois estados conformacionais da molécula da

hemoglobina, a qual se difere na afinidade pelo oxigênio. Essas duas conformações quaternárias são conhecidas como estados T (tenso) e R (relaxado), respectivamente. No estado T, as interações entre os heterodímeros são mais fortes; no estado R, essas ligações não covalentes são, no total, mais fracas. A afinidade pelo O_2 é menor no estado T e maior no estado R. A transição entre essas estruturas é acompanhada pelo rompimento das ligações não covalentes existentes e a formação de novas nas interfaces dos heterodímeros (Fig. 5.6). O contato entre os dois heterodímeros $\alpha\beta$ (Fig. 5.5) é estabilizado por uma mistura de pontes de hidrogênio e interações eletrostáticas. Aproximadamente 30 aminoácidos participam das interações não covalentes que caracterizam as conformações da Hb desoxigenada e oxigenada.

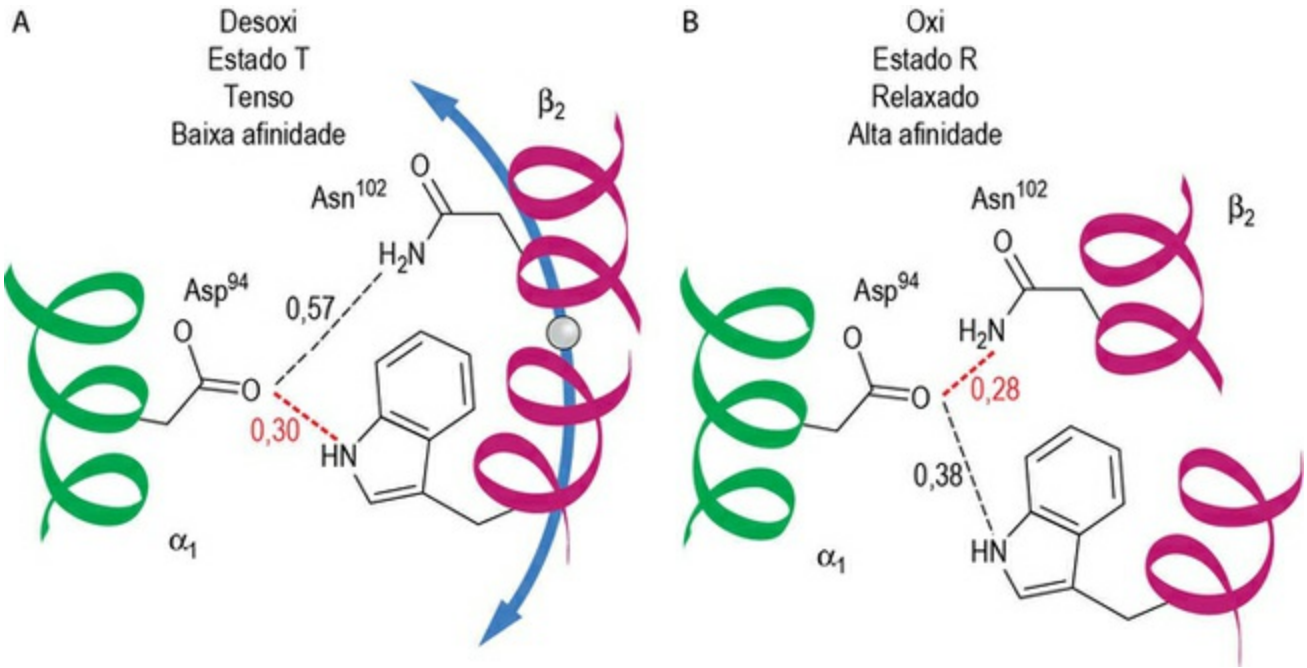


FIG. 5.6 As ligações não covalentes diferem-se na hemoglobina oxigenada e não oxigenada. No meio da interface entre os dois heterodímeros αβ estão os resíduos $Asp^{94(\alpha)}$ na α_1-globina de um heterodímero e $Trp^{37(\beta)}$ e $Asn^{102(\beta)}$ na β_2-globina de outro heterodímero (tracejado oval na Figura 5.5). Cada um deles tem átomos na cadeia lateral capazes de interações não covalentes. **(A)** No estado T, desoxigenado, a distância entre os resíduos de Asp e Trp favorecem a ponte de hidrogênio, enquanto a distância entre Asp e Asn é muito grande. **(B)** Como resultado das mudanças conformacionais que acompanham a transição para o estado R, oxigenado, a distância entre Asp e Trp é agora muito grande, mas aquela entre Asp e Asn é compatível com a formação de uma nova ponte de hidrogênio. Em outros locais ao longo dessa interface, outras ligações são criadas e desfeitas. Um alinhamento idêntico de resíduos e interações não covalentes é encontrado entre os monômeros de globinas α_2 e β_1. As distâncias são mostradas em nm. As pontes de hidrogênio costumam ter 0,27-0,31 nm de comprimento.

Vários modelos têm sido desenvolvidos para descrever a transição entre os estados T e R da hemoglobina. Em um extremo, está um modelo no qual cada subunidade de Hb responde sequencialmente à ligação do O_2 com uma mudança conformacional, o que possibilita intermediários híbridos dos estados T e R. No extremo oposto, encontra-se um modelo no qual todas as quatro subunidades alternam-se de modo ordenado; os estados híbridos são proibidos, e a ligação de O_2 a uma subunidade desloca o equilíbrio

de todas as subunidades do estado T para o estado R, simultaneamente. As estruturas moleculares da Hb desoxigenada e parcial e completamente ligada têm sido extensivamente estudadas por meio de uma série de técnicas termodinâmicas e cinéticas. Até o momento, conciliar as inconsistências entre os modelos clássicos e os mais recentes tem sido um processo lento. Estes diferentes pontos de vista acerca das alterações conformacionais em proteínas multissubunidades são discutidos mais detalhadamente na seção sobre enzimas alostéricas no Capítulo 6.



Quadro de teste clínico

Oximetria de pulso

A oximetria de pulso *(pulse-ox)* é um método não invasivo para estimar a saturação pelo oxigênio da Hb arterial. Dois princípios físicos estão envolvidos: primeiro, as características espectrais nas luzes visível e infravermelha da oxi-Hb e da desoxi-Hb são diferentes; segundo, o fluxo do sangue arterial tem um componente pulsátil que resulta de alterações de volume com cada batida do coração. As dosagens de transmissão ou reflectância são feitas em um tecido translúcido com fluxo sanguíneo razoável, comumente um dedo da mão ou do pé, ou orelha, de adultos e crianças, ou pé ou mão em bebês. O fotodetector e o microprocessador do oxímetro de pulso possibilitam um cálculo da saturação pelo oxigênio (SpO_2 = saturação do oxigênio periférico) que tipicamente está em 4-6% do valor encontrado pela análise gasosa do sangue arterial.

A oximetria de pulso é usada para monitorar o estado cardiopulmonar durante a anestesia local e geral, nas unidades de tratamento intensivo e neonatal, e durante o transporte do paciente. Os movimentos do corpo, a luz ambiente irradiada, a bilirrubina aumentada e as unhas postiças ou pintadas podem interferir na oximetria de pulso.

Convencionalmente, instrumentos com dois comprimentos de onda "presumem" que as dosagens ópticas estão associadas às hemoglobinas oxigenadas e desoxigenadas; eles não conseguem discriminar entre oxi-, desoxi- e metHb. Tecnologias mais novas, entretanto, utilizam seis ou oito comprimentos de onda e possibilitam a discriminação de várias espécies de Hb com uma exatidão de ±2,0% e uma precisão de ±1,0%.

Modulação alostérica da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio

Proteínas alostéricas e efetores

A Hb é uma proteína alostérica; sua afinidade pelo O_2 é regulada por pequenas moléculas

A Hb é um dos exemplos mais bem estudados de proteína alostérica. Essas pequenas moléculas ligam-se às proteínas em sítios que são diferentes espacialmente dos sítios de ligação do ligante – por isso, sua designação como **efetores alostéricos (significando outro local ou sítio)**. Por meio de efeitos conformacionais de longo alcance, eles alteram a afinidade de ligação ao ligante ou ao substrato da proteína. As proteínas alostéricas costumam ser proteínas multissubunidades. A afinidade de ligação ao O_2 da Hb é afetada positivamente pelo O_2, assim como por vários efetores alostéricos quimicamente diferentes, como H^+, CO_2 e 2,3-bifosfoglicerato (2,3-BPG) (Fig. 5.7). Quando um efetor alostérico afeta sua própria ligação à proteína (em outro sítio), o processo é denominado **homotrópico**; por exemplo, o efeito da ligação do O_2 em um sítio da Hb aumenta a afinidade para a ligação de O_2 em outros sítios na Hb. Quando o efetor alostérico é diferente do ligante cuja ligação é alterada, o processo é denominado **heterotrópico**; por exemplo, o efeito do H^+ (pH) sobre a P_{50} para a ligação do oxigênio à Hb. Essas interações levam a deslocamentos horizontais nas curvas de ligação ao O_2 (Fig. 5.7).

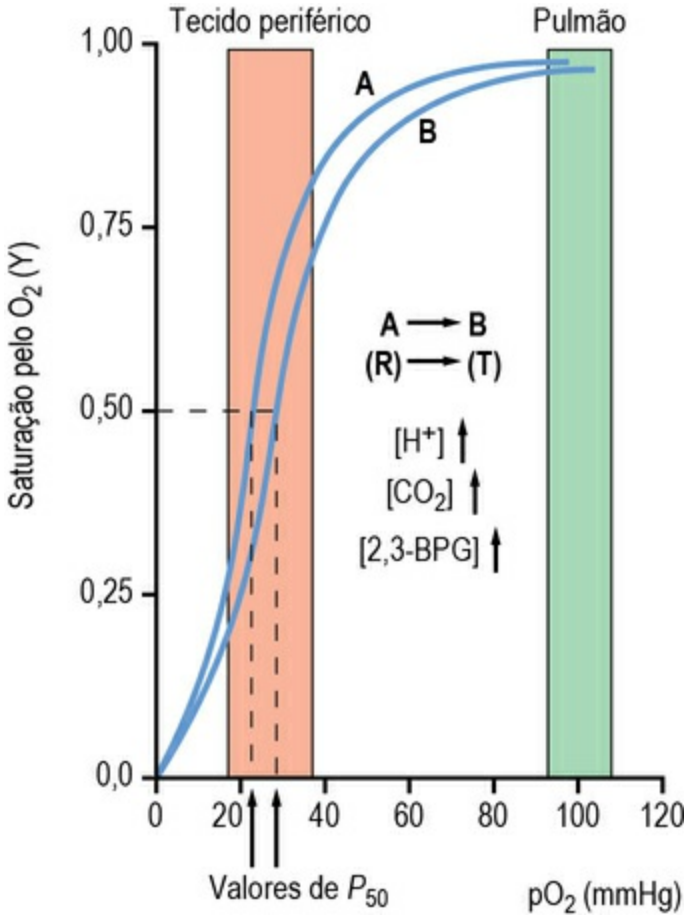


FIG. 5.7 Os efetores alostéricos diminuem a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio. A interação do O_2 com a Hb é regulada por efetores alostéricos. Em condições fisiológicas, a HbA exibe uma curva de saturação pelo O_2 altamente cooperativa. Com um aumento na concentração no eritrócito de qualquer um dos três efetores alostéricos, H^+, CO_2 ou 2,3-bifosfoglicerato (2,3-BPG), a curva desloca-se para a direita **(posição B),** indicando uma afinidade diminuída pelo O_2 (aumento no valor de P_{50}). As ações dos efetores que modulam a afinidade pelo O_2 parecem ser aditivas. Por outro lado, um decréscimo em qualquer um dos efetores alostéricos desloca a curva para a esquerda **(posição A).** O aumento da temperatura também desloca a curva para a direita. A sensibilidade da saturação pelo O_2 ao H^+ é conhecida como efeito Bohr. As faixas normais de O_2 medidas nos capilares pulmonares e dos tecidos periféricos estão indicadas pelas áreas sombreadas.

Efeito Bohr

O pH ácido (prótons) diminui a afinidade da Hb pelo O_2

A afinidade da Hb pelo oxigênio é muito sensível ao pH, um fenômeno conhecido como efeito Bohr. O efeito Bohr é mais bem descrito como um deslocamento para a direita na curva de saturação pelo O_2 com o decréscimo do pH. Portanto, uma concentração maior de H^+ (pH diminuído) favorece uma P_{50} aumentada (afinidade menor) para a ligação do O_2 com a Hb, **equivalente a um deslocamento dependente de H^+ da Hb do estado R para o estado T**.

Para entender o efeito Bohr no nível estrutural da proteína e para estimar o papel do H^+ como um efetor alostérico heterotrópico, é importante lembrar que a Hb é uma molécula altamente carregada. Os resíduos que participam do efeito Bohr contemplam o grupo

amino da Val *N*-terminal da α-globina e a cadeia lateral da His *C*-terminal da β-globina. Os valores de pK_a desses ácidos fracos diferem-se suficientemente entre as formas desoxigenadas e oxigenadas da Hb para causar a captação de 1,2-2,4 prótons pelo tetrâmero desoxigenado, comparado ao oxigenado.

A identificação de resíduos de aminoácidos específicos das α e β-globinas que participam no efeito Bohr é complicada pelas interações diferenciais de outros solutos carregados com a desoxi-Hb e com a oxi-Hb. Portanto, a ligação preferencial de um dado ânion, isto é, Cl^- e/ou fosfatos orgânicos, à Hb desoxigenada envolve a alteração dos p*K*s de alguns grupos catiônicos, contribuindo para o efeito Bohr observado como um todo. Por exemplo, existem fortes evidências mostrando que a $Val^{1(\alpha)}$ é relevante para o efeito Bohr apenas na presença de Cl^-. O p*K*a desse grupo muda de 8,0 na Hb desoxigenada para 7,25 na Hb oxigenada na presença de concentração fisiológica de Cl^- (≈100 mmol/L). Além disso, a participação dos grupos $Val^{1(\alpha)}$ no efeito Bohr dependente de cloreto é fortemente modulada pelo CO_2, devido à formação de adutos de CO_2 (carbamino) na Hb (a seguir).

Conforme a Hb liga O_2, os prótons dissociam-se de grupos funcionais de ácidos fracos selecionados. Ao contrário, em meio ácido, a protonação de bases conjugadas inibe a ligação do O_2

Durante sua circulação entre os alvéolos pulmonares e os capilares de tecidos periféricos, os eritrócitos encontram condições marcadamente diferentes de pO_2 e pH. A alta pO_2 nos pulmões promove a saturação pelo ligante e força os prótons da molécula de Hb a estabilizarem o estado R. No leito capilar, particularmente em tecidos metabolicamente ativos, o pH é levemente mais baixo, devido à produção de metabólitos ácidos, como o lactato. A Hb oxigenada, ao entrar nesse ambiente, irá adquirir alguns prótons em "excesso" e mudar para o estado T, promovendo a liberação de O_2 para a captação pelos tecidos para o metabolismo aeróbico.

Efeitos do CO_2 e da temperatura

Como o H^+, o CO_2 é aumentado em capilares venosos e é um efetor alostérico negativo da afinidade da Hb pelo O_2

A capacidade do CO_2 de alterar a afinidade da Hb pelo O_2 está intimamente relacionada ao efeito Bohr. O aumento na pCO_2 nos capilares venosos diminui a afinidade da Hb pelo O_2. Consequentemente, ocorre um deslocamento para a direita na curva de saturação pelo ligante conforme a pCO_2 aumenta. Deve ser enfatizado que o efetor alostérico é, de fato, o CO_2, e não o HCO_3^-. O CO_2 reage reversivelmente com os grupos amino *N*-terminais desprotonados dos polipeptídios globina para formar **adutos carbamino**:

$$Hb — NH_2 + CO_2 \rightleftharpoons Hb — NHCOO^- + H^+$$

Essa modificação química covalente transiente da Hb não é apenas um exemplo especializado de controle alostérico, resultando na estabilização da Hb desoxigenada. Ela também representa uma forma de transporte de CO_2 para os pulmões para eliminá-lo do corpo. Entre 5-10% do conteúdo total de CO_2 do sangue existe como adutos carbamino.

Há uma forte correlação fisiológica entre pCO_2 e a afinidade da Hb pelo O_2. O CO_2 é o principal produto da oxidação mitocondrial e, assim como o H^+, é particularmente abundante em tecidos metabolicamente ativos. Uma vez se difundindo no sangue, o CO_2 pode reagir com a Hb oxigenada, deslocar o equilíbrio na direção do estado T e promover a dissociação do O_2 ligado (Fig. 5.7). A maioria do CO_2 do tecido periférico está, entretanto, na presença de **anidrase carbônica** do eritrócito, hidratado a ácido carbônico (H_2CO_3), um ácido fraco que se dissocia parcialmente em H^+ e HCO_3^-:

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3 \text{ rea ç ã o catalisada por enzima}$$

$$H_2CO_3 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^- \text{ dissocia ç ã o espont â nea}$$

Curiosamente, um *pool* adicional de prótons é gerado a partir da formação de aduto carbamino e das reações de hidratação/dissociação envolvendo CO_2, os prótons que se tornam disponíveis para participar do efeito Bohr e facilitar a troca O_2—CO_2. Durante seu retorno aos pulmões, o sangue transporta duas formas de CO_2: a carbamino-Hb e o par acidobásico conjugado H_2CO_3/HCO_3^-. O sangue e a Hb estão agora expostos a uma baixa pCO_2 e, por meio da ação das massas, a formação de aduto carbamino é revertida e a ligação de O_2, novamente favorecida. Do mesmo modo, nos capilares pulmonares, a anidrase carbônica dos eritrócitos converte H_2CO_3 a CO_2 e H_2O, que são expirados para a atmosfera (Cap. 25).

Os músculos em exercício não produzem apenas os efetores alostéricos H^+ e CO_2 como produtos do metabolismo aeróbico, mas também liberam calor. Como a ligação de O_2 ao heme é um processo exotérmico, **a afinidade da Hb pelo O_2 diminui com o aumento na temperatura**. Portanto, o microambiente de um músculo em exercício favorece profundamente uma liberação mais eficiente de O_2 ligado à Hb no tecido circundante.

Efeito do 2,3-bifosfoglicerato

O 2,3-bifosfoglicerato (2,3-BPG), um intermediário no metabolismo de carboidratos, é um importante efetor alostérico da Hb

O 2,3-BPG é sintetizado nos eritrócitos humanos em um desvio de uma etapa da via glicolítica (Cap. 12). Como o H^+ e o CO_2, o 2,3-BPG é um efetor alostérico negativo indispensável que, quando ligado à Hb, causa um aumento marcante na P_{50} (Fig. 5.7). Se não fosse pela alta concentração no eritrócito de 2,3-BPG (4,1 mmol/L, quase a mesma da Hb), a curva de saturação da Hb pelo O_2 se aproximaria daquela da Mb!

Em uma extremidade do eixo de simetria bipolar, dentro da estrutura quaternária da Hb, existe uma fenda estreita definida por aminoácidos catiônicos de subunidades β-globina justapostas (Fig. 5.8). Apenas uma molécula de 2,3-BPG liga-se a esse sítio. **Uma consequência fundamental das diferenças conformacionais entre os estados T e R é que a Hb desoxigenada interage preferencialmente com o 2,3-BPG negativamente carregado**. Interações eletrostáticas múltiplas estabilizam o complexo entre o efetor polianiônico e a Hb desoxigenada. A fenda é muito estreita na Hb totalmente oxigenada para acomodar o 2,3-BPG.

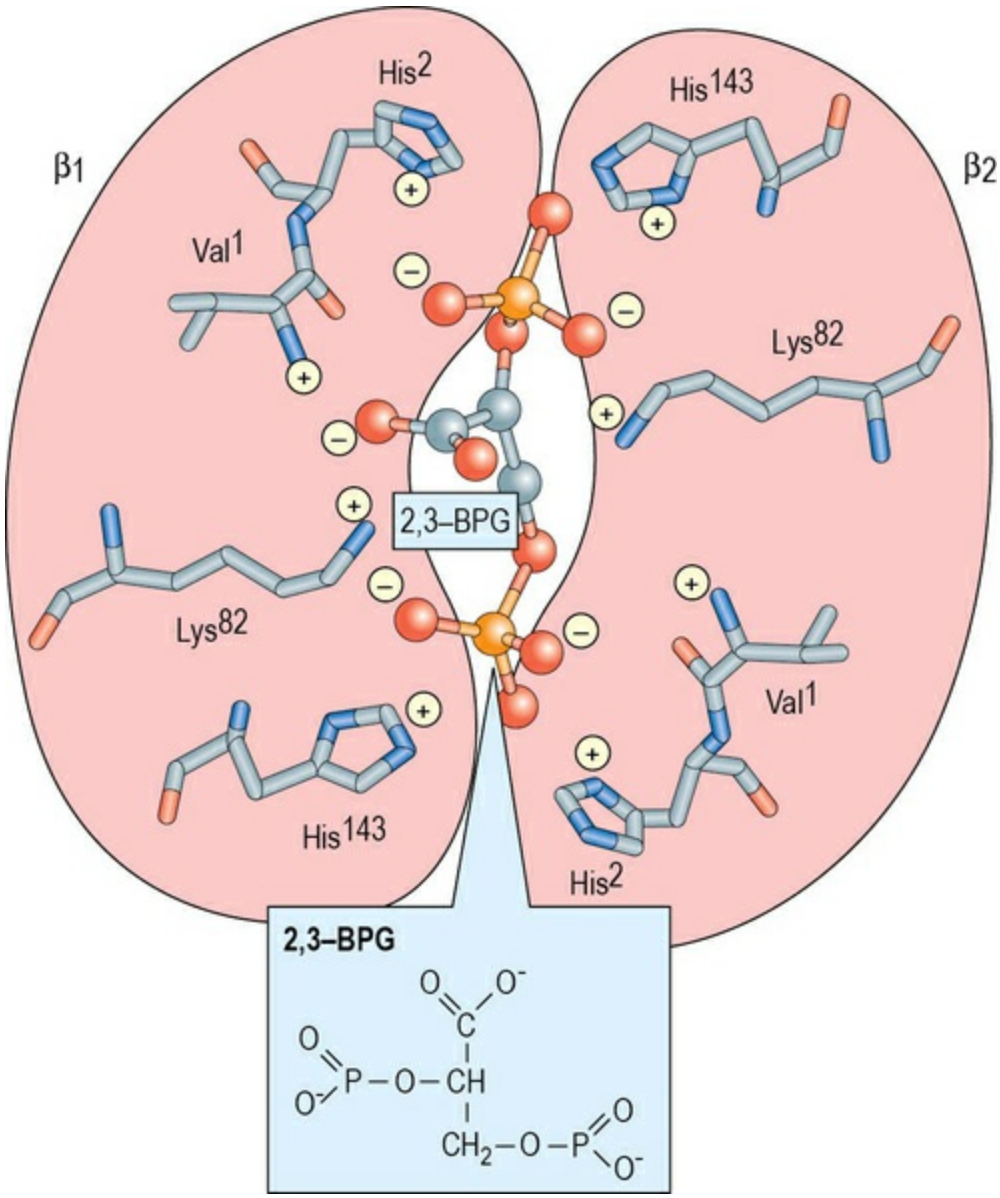


FIG. 5.8 O 2,3-bifosfoglicerato liga-se preferencialmente à hemoglobina desoxigenada. Na superfície do tetrâmero da Hb desoxigenada, em que duas β-globinas (púrpura) interagem, existe uma fenda formada pelo resíduo de aminoácido *N*-terminal ($Val^{1(\beta)}$) e as cadeias laterais da $His^{2(\beta)}$, $Lys^{82(\beta)}$ e $His^{143(\beta)}$ (modelos em bastão). Esse sítio consiste em oito grupos catiônicos, suficientes para ligar com alta afinidade uma molécula de 2,3-BPG (modelo bola e bastão; fósforo em laranja), uma molécula com cinco grupos aniônicos em pH fisiológico. Esse arranjo de cargas positivas não existe na Hb oxigenada. Na Hb fetal (HbF), a $His^{142(\beta)}$ é substituída por um resíduo de Ser.

Quadro de conceitos avançados

Hemoglobinas artificiais

As curvas de oferta e procura do sangue total e a disponibilidade e a utilização das hemácias embaladas apontam para uma crise iminente e a necessidade de desenvolver alternativas. Substitutos para as hemácias são as transfusões, alternativas potencialmente úteis durante procedimentos cirúrgicos grandes e em emergências de choque hemorrágico.

Três tipos de carreadores de O_2 artificiais têm sido investigados: o carreador de oxigênio à base de Hb (HBOC), a Hb encapsulada em lipossoma — ou nanopartículas

— e as emulsões de perfluorocarbono. Os HBOCs são hemoglobinas derivadas de fontes alogênicas, xenogênicas ou recombinantes, que têm sido modificadas por polimerização, ligação cruzada ou conjugação. Essas modificações facilitam a purificação e a esterilização e minimizam a toxicidade e a imunogenicidade. Elas também são importantes para estabilizar os tetrâmeros de Hb extracelulares; por outro lado, a hemoglobina dissocia-se em dímeros e monômeros no plasma e é excretada na urina. As formas artificiais têm uma afinidade pelo O_2 (P_{50}) na faixa 16-38 mmHg, mas geralmente possuem efeitos de cooperatividade (n = 1,3-2,1) e de Bohr diminuídos.

Vários HBOCs atravessaram uma extensa avaliação clínica, e alguns são usados em procedimentos médicos em alguns países. Os efeitos adversos não são incomuns nos HBOCs. Ocorre maior vasoconstrição com hipertensão subsequente, um resultado da ligação aumentada do óxido nítrico (NO), um regulador endógeno da vasodilatação, pela Hb extracelular. Outros problemas são a oxidação aumentada do heme a metHb, maior deposição de ferro nos tecidos, desconforto gastrintestinal, neurotoxicidade e interferência nas dosagens diagnósticas. A modelação molecular da Hb humana, atualmente em curso em vários laboratórios, procura melhorar a ligação do O_2, as propriedades alostéricas e os efeitos secundários dos HBOCs. A encapsulação da hemoglobina em lipossomas ou nanocápsulas, produzindo eritrócitos artificiais, constitui também uma estratégia promissora, uma vez que limita o escape de Hb para os espaços extravasculares.

A importância do 2,3-BPG como um efetor alostérico é ressaltada por observações de que sua concentração no eritrócito muda em resposta a várias condições fisiológicas e patológicas. Durante a hipoxia crônica (pO_2 diminuída) secundária a uma doença pulmonar, anemia ou choque, o nível de 2,3-BPG aumenta. Tais aumentos compensatórios também têm sido descritos em fumantes e na adaptação a grandes altitudes. O resultado final é uma maior estabilização do estado T desoxigenado, de baixa afinidade, e um deslocamento adicional da curva de saturação para a direita, o que facilita a liberação de mais O_2 para os tecidos. Na maioria das circunstâncias, o deslocamento à direita tem um efeito insignificante na saturação da Hb pelo O_2 nos pulmões.

Tópicos selecionados

Interação da hemoglobina com o óxido nítrico

O óxido nítrico, um potente vasodilatador, é armazenado na Hb sob a forma de S-nitrosoHb (SNO-Hb)

O óxido nítrico (NO) é um radical livre gasoso capaz de modificar por oxidação (nitração, nitrosação, nitrosilação) macromoléculas biológicas. Além disso, sua molécula altamente reativa, também conhecida como **fator relaxante derivado do endotélio (EDRF)**, é sintetizada nas células endoteliais e participa da fisiologia vascular normal, incluindo a

vasodilatação (músculo liso), a hemostase (plaquetas) e a expressão de moléculas de adesão (célula endotelial). Os eritrócitos são os maiores reservatórios intravasculares de NO bioativo e a Hb é indispensável para sua formação, seu armazenamento e sua liberação. A SNO-Hb é o produto da *S*-nitrosilação das cadeias laterais da $Cys^{93\beta}$ da Hb. Esses grupos tióis da Cys podem aceitar NO pela transferência a partir da *S*-nitrosoglutationa intracelular ou do NO ligado ao heme (nitrosil-Hb). O NO é liberado pela troca a partir da SNO-Hb para as cadeias laterais de Cys da trocadora de ânion 1, uma proteína da membrana do eritrócito que pode liberar NO para o plasma. A formação e a decomposição da SNO-Hb são sensíveis à pO. O NO é liberado da Hb em resposta à hipoxia ou na conversão para o estado T, por exemplo nos capilares venosos.

Quadro de conceitos avançados

Doença aguda da montanha (alto demais, rápido demais)

A doença aguda da montanha (AMS, *acute mountain sickness*) desenvolve-se em indivíduos que sobem rapidamente ambientes de hipoxia hipobárica. Os sintomas são falta de ar, taxa cardíaca rápida, dor de cabeça, náuseas, anorexia e transtornos do sono. Esses sintomas podem se desenvolver em altitudes de 2.000 m (25% de incidência) e a 4.000 m ou mais (50% de incidência). A forma mais grave é o edema cerebral de altitude elevada (2% de incidência), uma condição potencialmente fatal, caracterizada por ataxia e outros problemas neuromusculares e neurológicos.

A 4.000 m, a pressão barométrica é 460 mmHg, levando a uma pressão parcial de O_2 ambiental de 96 mmHg (nível do mar, 160). Cálculos fisiológicos produzem valores de uma pO_2 traqueal de 86 mmHg (nível do mar, 149), pO_2 alveolar de 50 mmHg (nível do mar, 105) e pO_2 arterial de 45 mmHg (nível do mar, 100). Nessa pressão parcial arterial de O_2, a saturação da Hb é de apenas 81% (Fig. 5.4). Consequentemente, a capacidade carreadora de O_2 do sangue arterial diminui a 160 mL/L (nível do mar, 198). A hipoxia também pode levar a superperfusão dos leitos vasculares, derrame endotelial e edema.

Os seres humanos adaptam-se a altitudes elevadas (aclimatização) por meio de vários mecanismos. A hiperventilação é uma resposta de curto prazo fundamental que serve para diminuir a pCO_2 alveolar e, por sua vez, aumentar a pO_2 alveolar. O pH arterial também é aumentado durante a hiperventilação, levando a uma maior afinidade da Hb pelo O_2. O aumento gradual no 2,3-BPG costuma ocorrer em resposta à hipoxia crônica. Outro importante mecanismo adaptativo é a policitemia, um aumento na concentração de eritrócitos que resulta da estimulação da eritropoetina das células da medula óssea. Dentro de uma semana de aclimatização, a concentração de Hb pode aumentar para valores de até 20% para fornecer um conteúdo de O_2 arterial próximo do normal.

Outro processo notável dentro do eritrócito é a conversão regulada alostericamente do nitrito (NO_2^-) a NO, uma reação realizada pela Hb desoxigenada. Essa atividade

intrínseca de "nitrito redutase" aproveita-se da concentração moderada de NO_2^- no eritrócito (até 0,3 μmol/L). Embora a química seja complexa, a reação parece gerar um intermediário lábil nitrosil-metHb(férrica) que pode transferir prontamente NO para a $Cys^{93(\beta)}$ na Hb oxigenada.



Quadro clínico

Estudante com hiperventilação, dormência e vertigem

Uma estudante universitária com espasmos musculares graves nos braços, dormência nas extremidades, alguma vertigem e dificuldade respiratória foi levada ao centro de saúde estudantil. A paciente havia se exercitado vigorosamente com o intuito de aliviar o estresse das provas quando repentinamente começou a sentir a respiração rápida e forçada. Suspeitando de hiperventilação, um profissional da área de saúde começou a tranquilizar a estudante e ajudou na sua recuperação fazendo-a respirar em um saco de papel. Após 20 minutos os espasmos cessaram, a sensibilidade voltou aos seus dedos e a vertigem foi resolvida.

Comentário

A hiperventilação alveolar é um padrão de respiração anormalmente rápido, profundo e prolongado que leva à alcalose respiratória, ou seja, um decréscimo profundo na pCO_2 e um aumento no pH sanguíneo que se pode atribuir a uma perda aumentada de CO_2 do corpo. Com $[CO_2]$ e $[H^+]$ diminuídas, dois efetores alostéricos da ligação e da liberação de O_2, a afinidade da Hb pelo O_2 aumenta suficientemente para reduzir a eficiência de liberação de O_2 nos tecidos periféricos, inclusive no sistema nervoso central. Outra característica da alcalose é um nível diminuído de cálcio ionizado no plasma, uma situação que contribui para os espasmos e as câimbras musculares. Em geral, a hiperventilação pode ser disparada por hipoxemia, doenças cardíacas e pulmonares, distúrbios metabólicos, agentes farmacológicos e ansiedade. Veja também o Capítulo 25.

Neuroglobina e citoglobina: hemoglobinas secundárias em mamíferos

Duas outras globinas foram recentemente identificadas em humanos

A neuroglobina (Ngb) é expressa principalmente no sistema nervoso central e em alguns tecidos endócrinos; já a citoglobina (Cygb) é expressa ubiquamente, primariamente nas células de origem fibroblástica. As concentrações teciduais de ambas são <1 mmol/L. O polipeptídio Ngb tem 151 resíduos de aminoácidos (16.933 Da), enquanto a Cygb contém 190 resíduos (21.405 Da), com "extensões" de 20 aminoácidos nas extremidades *N*-terminal e *C*-terminal (Fig. 5.1). Ambas as proteínas humanas compartilham apenas cerca

de 25% de identidade de sequência com a Mb e a Hb. Todos os elementos-chave do empacotamento da globina estão presentes: o sanduíche de α-hélice três sobre três; resíduos de His proximal e distal, e uma bolsa hidrofóbica contendo heme.

Ao contrário da Mg e da Hb, a Ngb e a Cygb contêm hemes hexacoordenados para os estados de valência Fe^{2+} e Fe^{3+}. A HisE7 distal, servindo como o sexto ligante, precisa ser deslocada para tornar possível a ligação de O_2. Além disso, as afinidades da Ngb e da Cygb são surpreendentemente altas, com valores de P_{50} na faixa de 1-7,5 mmHg e 0,7-1,8 mmHg, respectivamente, comparados com uma P_{50} <27 mmHg para a Hb. A ligação de O2 à Cygb dimérica é cooperativa (coeficiente de Hill = 1,2-1,7), porém independente do pH. Por outro lado, a Ngb monomérica exibe uma afinidade pelo O_2 dependente do pH. As funções dessas globinas secundárias permanecem desconhecidas. A Ngb parece ser comparável à Mb, mediando a liberação de O_2 para a mitocôndria da retina. Tem sido proposto que a Cygb funcione como um cofator enzimático, fornecendo O_2 para a hidroxilação das cadeias laterais de Pro e Lys em algumas proteínas.

Variantes de hemoglobina

Mais de 95% da Hb encontrada em adultos humanos é **HbA**, com a composição de subunidades de globina $\alpha_2\beta_2$. A HbA_2 representa 2-3% do total e tem uma composição polipeptídica $\alpha_2\delta_2$. A **HbA_2** está elevada na β-talassemia, uma doença caracterizada por deficiência na biossíntese de β-globina. Funcionalmente, essas duas hemoglobinas de adultos são indistinguíveis. Não surpreendentemente, as mutações no gene que codifica a δ-globina não apresentam consequência clínica.

Outra Hb secundária é a **Hb fetal, HbF**; suas subunidades são a α-globina e a γ-globina. Enquanto ela está presente em não mais do que 1% da Hb de adulto, a HbF predomina no feto durante o segundo e o terceiro trimestres da gestação e no neonato. O desligamento do gene no cromossomo 11 causa um decréscimo brusco após o nascimento. A diferença funcional mais notável entre HbF e HbA é sua sensibilidade diminuída ao 2,3-BPG. A comparação da estrutura primária dos polipeptídios β-globina e γ-globina revela a substituição da $His^{143\beta}$ pela Ser na γ-globina (Fig. 5.1). Consequentemente, dois grupos catiônicos que participam da ligação do efetor alostérico aniônico não estão mais disponíveis (Fig. 5.8). Evidentemente, a interação do 2,3-BPG com a HbF é mais fraca, que resulta em uma afinidade maior pelo O_2 (P_{50} de 19 mmHg para a HbF comparada com 27 mmHg para a HbA) e em maior estabilização do estado R oxigenado. **O benefício direto para essa alteração estrutural e funcional da isoforma HbF é uma transferência mais eficiente de O_2 da HbA materna para a HbF fetal** (Fig. 5.4). A separação dessas e de outras variantes de Hb no laboratório clínico é realizada por análises eletroforéticas e cromatográficas (Fig. 5.9).

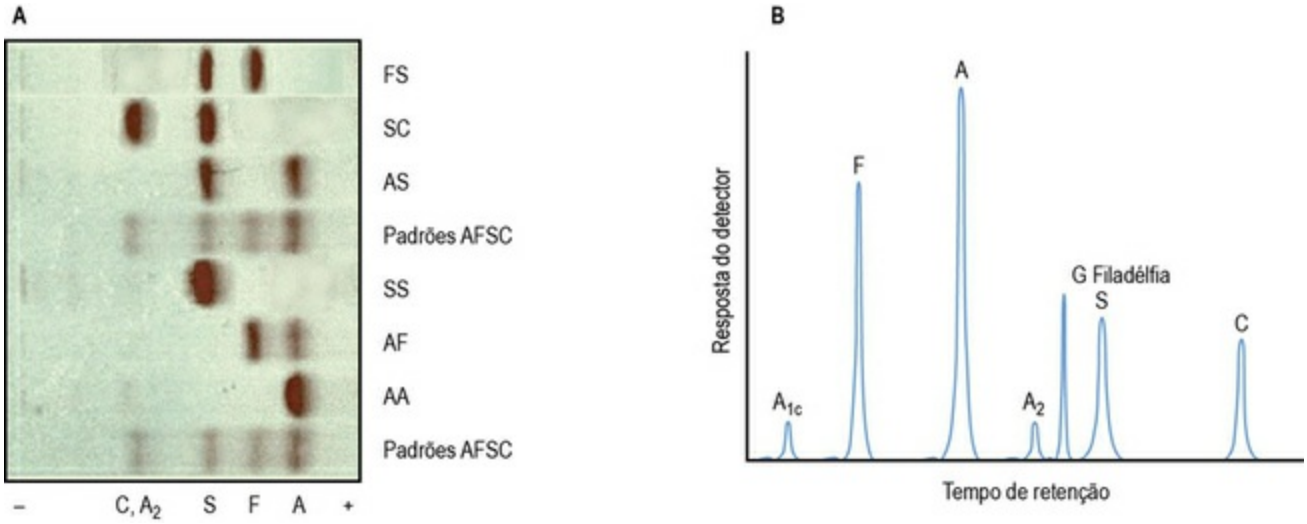


FIG. 5.9 As hemoglobinas normais e anormais podem ser separadas por métodos eletroforéticos e cromatográficos. **(A)** Esse painel mostra a eletroforese em acetato de celulose (pH 8,4) de amostras de sangue obtidas de triagem neonatal. Essa técnica rápida tentará identificar HbS e HbC, duas hemoglobinas mutantes comuns na população afro-americana. Outros testes são necessários para um diagnóstico definitivo. FS, neonato com anemia falciforme; SC, criança duplamente heterozigota com doença semelhante à anemia falciforme; AS, criança com traço falciforme; AF, neonato normal. **(B)** Esse perfil ilustra a cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) com uma fase sólida trocadora de cátions, uma técnica capaz de separar e quantificar mais de 40 hemoglobinas. A HPLC pode também ser usada para dosar a HbA_{1c}, uma proteína glicosilada que é medida clinicamente como um índice da concentração de glicose sanguínea média no diabetes melito. Também é mostrado o padrão de eluição da Hb G Filadélfia ($Asn^{68(\alpha)} \rightarrow Lys$), uma variante comum, porém benigna, que comigra com a HbS na eletroforese.

Quadro de teste clínico

Separação de hemoglobinas variantes e mutantes; diagnóstico de hemoglobinopatias

A mobilidade de uma proteína durante a eletroforese ou a cromatografia é determinada por sua carga e sua interação com a matriz. Três técnicas comumente usadas fornecem resolução suficiente para separar variantes de Hb que diferem da HbA em uma única carga: eletroforese, focalização isoelétrica e cromatografia de troca iônica. As separações eletroforéticas e cromatográficas da Hb estão ilustradas na Figura 5.9.

O volume de hemolisado necessário (<100 μL) torna essas técnicas adequadas para amostras de sangue de neonatos e adultos. A quantificação é realizada pela densitometria de varredura ou por espectrometria de absorção. As indicações de anormalidades em testes de triagem são seguidas pela contagem sanguínea completa (Tabela 5.2), análise proteica adicional e análise do DNA para identificar mutações específicas nos genes de globina.

Tabela 5.2

Contagem sanguínea completa (CSC)

Parâmetro	Paciente (masculino)	Valor de referência (unidades SI)*
Contagem de leucócitos, WBC	6,82 × 10^9/L	4,0-11,0 × 10^9/L
Contagem de eritrócitos, RBC	4,78 × 10^{12}/L	4,0-5,2 × 10^{12}/L (F); 4,5-5,9 × 10^{12}/L (M)
Hemoglobina, Hb	6,1 mmol/L	7,4-9,9 mmol/L (F); 8,4-10,9 mmol/L (M)
Hematócrito, HCT	33,4%	41%-46% (F); 37%-49% (M)
Volume corpuscular médio, MCV	71,9 fL	80-96 fL
Hemoglobina corpuscular média, MCH	21,3 pg/célula	26-34 pg/célula
Concentração de hemoglobina corpuscular média, MCHC	296 g/L	320-360 g/L
Amplitude da distribuição de eritrócitos, RDW	17,7%	11,5%-14,5%
Contagem de plaquetas, PLT	274 × 10^9/L	150-350 × 10^9/L
Volume médio de plaquetas, MPV	8,6 fL	6,4-11,0 fL

*M, mulheres; H, homens; fL, 10^{-15} L; pg, 10^{-12} g. Para converter mmol Hb/L para a g Hb/dL, multiplique por 0,01611. A avaliação laboratorial automatizada do sangue fornece informações inestimáveis para o diagnóstico e o monitoramento de problemas de saúde. A contagem completa, realizada em uma amostra de sangue total, inclui as contagens de células sanguíneas vermelhas (eritrócitos), células brancas (leucócitos) e plaquetas, além de índices quantitativos das hemácias (MCV, MCH, MCHC e RDW). Os resultados descrevem o estado hematopoético da medula óssea e a presença de anemia e sua possível causa. Os dados apresentados são característicos de um indivíduo com anemia por deficiência em ferro: baixa HGB, baixo MCV (microcitose) e baixo MCH (hipocromia). Veja também valores de referência no Apêndice 1.

Doença falciforme, uma hemoglobinopatia comum

Na anemia falciforme (AF), a distorção da estrutura dos eritrócitos (afoiçamento) limita o fluxo sanguíneo capilar

A anemia falciforme (AF), um distúrbio herdado da estrutura da Hb, caracteriza-se por uma tendência dos eritrócitos de se distorcerem e limitarem o fluxo sanguíneo nos leitos capilares. Clinicamente, um indivíduo com AF apresenta episódios intermitentes de anemia hemolítica, que resultam na lise crônica das hemácias e em crises vaso-oclusivas dolorosas. São também características comuns crescimento diminuído, suscetibilidade a infecções aumentada e danos a vários órgãos. Na população afro-americana nos Estados Unidos, a AF afeta 90-100.000 indivíduos, com frequência de 0,2%. Os heterozigotos, na maioria assintomáticos, são 8% nessa mesma população.

A AF é causada por mutação pontual herdada no gene que codifica a β-globina, levando à expressão da **variante HbS** da Hb. Na verdade, a HbS tem sido estudada bioquímica, biofísica e geneticamente por mais de 50 anos, tornando a AF o paradigma de uma doença molecular. A mutação é $Glu^{6(\beta)} \rightarrow Val$: um aminoácido carregado localizado na superfície é substituído por um resíduo hidrofóbico. A valina na subunidade β-globina mutante encaixa-se numa bolsa complementar (às vezes chamada

de "remendo de aderência") formada na subunidade β-globina de uma molécula de Hb desoxigenada, uma bolsa que se torna exposta somente após a liberação do O_2 nos capilares teciduais.

A HbA permanece como um soluto verdadeiro, mesmo em altas concentrações, em grande parte como resultado de uma superfície exterior polar que é compatível e não reativa com as moléculas de Hb vizinhas. Por outro lado, a HbS, quando desoxigenada, é menos solúvel. Ela forma polímeros longos e filamentosos que precipitam facilmente, distorcendo a morfologia do eritrócito para a forma de foice característica. No indivíduo homozigoto com AF (HbS/HbS), o processo complexo de nucleação e polimerização ocorre rapidamente, produzindo cerca de 10% de eritrócitos circulantes em forma de foice. No indivíduo heterozigoto (HbA/HbS, traço falciforme), a cinética de afoiçamento é diminuída por um fator de pelo menos 1.000, o que explica a natureza assintomática desse genótipo. Em solução diluída, a HbS apresenta interações com o O_2 (valor de P_{50}, coeficiente de Hill) que são semelhantes àquelas da HbA. Entretanto, o efeito Bohr na HbS concentrada é mais pronunciado, levando a uma liberação maior de O_2 nos capilares e à propensão aumentada para o afoiçamento.

Os eritrócitos falciformes exibem menor deformabilidade. Eles não se movem mais livremente por meio da microvasculatura e frequentemente bloqueiam o fluxo sanguíneo, em especial no baço e nas articulações. Além disso, essas células perdem água, tornam-se frágeis e têm uma duração de vida consideravelmente menor, levando à **hemólise** e à **anemia**. Exceto durante extremo esforço físico, os indivíduos heterozigotos parecem normais. Por motivos ainda não elucidados, a heterozigosidade está associada a uma resistência aumentada à malária, especificamente ao crescimento do agente infeccioso *Plasmodium falciparum* no eritrócito. Essa observação representa um exemplo de vantagem seletiva que o heterozigoto HbA/HbS exibe sobre o HbA/HbA normal ou sobre o homozigoto HbS/HbS e, provavelmente, oferece uma explicação para a persistência da HbS no *pool* gênico.



Quadro clínico

Metemoglobinemia adquirida

Em uma região rural, um bebê de 4 meses foi visto em uma emergência local com episódios de convulsão, dificuldade respiratória e vômito. A pele do bebê e as membranas mucosas estavam azuladas, indicando cianose. A análise do sangue arterial revelou cor marrom-chocolate, pO_2 normal, saturação pelo O_2 de 60% e nível de metHb (heme férrico) de 35%.

A causa provável da metemoglobinemia tóxica aguda era a água (água de poço) contaminada por concentração de nitrato/nitrito de 34 mg/L. O bebê foi tratado com sucesso pela administração intravenosa de azul de metileno (1-2 mg/kg), que serve para acelerar indiretamente a redução enzimática da metHb à Hb normal (ferrosa) pela NADPH metHb redutase, a qual, normalmente, é uma via secundária para a conversão

de metHb a Hb.

Comentário

A metHb é formada quando o ferro ferroso do heme é oxidado a ferro férrico; ele é produzido espontaneamente em uma velocidade baixa e mais rapidamente na presença de certos fármacos, nitritos e corantes à base de anilina. Em formas genéticas de metemoglobinemia, a mutação na His proximal ou distal à Tyr torna o ferro do heme mais suscetível à oxidação (Tabela 5.1). O grau de oxidação dos tetrâmeros de Hb pode variar de um grupo heme até quatro. O eritrócito contém uma NADH-citocromo b_5 redutase, ou NADH diaforase, que é responsável pela maior parte da redução da metHb. Os bebês são particularmente vulneráveis à metemoglobinemia, pois seus níveis de NADH-citocromo b_5 redutase são a metade daqueles dos adultos. Além disso, seu alto nível de HbF é mais sensível a oxidantes comparado à HbA.

Outras hemoglobinopatias

Têm sido documentadas mais de 1.000 mutações em genes que codificam os polipeptídios α- e β-globina

Como ocorre com muitos eventos mutacionais, a maioria delas leva a poucos problemas clínicos. Existe, entretanto, centenas de mutações que dão origem a Hb anormais e a fenótipos patológicos. Geralmente, os mutantes de Hb ou hemoglobinopatias são denominados a partir do local (hospital, cidade ou região geográfica) no qual a proteína anormal foi primeiramente identificada. Elas são classificadas de acordo com o tipo de alteração estrutural e com a função alterada e as características clínicas resultantes (Tabelas 5.1 e 5.2). Enquanto muitas dessas mutações apresentam fenótipos previsíveis, outras são surpreendentemente pleiotrópicas em seus impactos sobre as diversas propriedades da molécula de Hb. Com poucas exceções, as variantes de Hb são herdadas como traços recessivos autossômicos. Às vezes, são identificados duplos heterozigotos, como a HbSC (Fig. 5.9).



Quadro clínico

Tratamento analgésico das crises vaso-oclusivas da anemia falciforme

A crise vaso-oclusiva aguda é o problema mais comum relatado por pacientes com AF; ela também é a razão mais frequente de tratamentos de emergência e de admissão hospitalar. Os episódios de dor vaso-oclusiva são imprevisíveis e frequentemente torturantes e incapacitantes. A origem dessa dor progressiva envolve as propriedades reológicas e hematológicas alteradas dos eritrócitos atribuídas à polimerização e agregação da HbS. A disfunção microvascular é precedida por uma resposta inflamatória, indicada pela elevação de proteínas plasmáticas de fase aguda. Por fim, as respostas vasomotoras diminuídas nas arteríolas e as interações adesivas entre

os eritrócitos em forma de foice e as células endoteliais nas vênulas pós-capilares restringem o fluxo sanguíneo aos tecidos por todo o corpo.

Os dados epidemiológicos indicam que 5% dos pacientes com AF devem experimentar 3-10 episódios de dor grave anualmente. Tipicamente, essa crise de dor se resolve entre 5-7 dias, mas uma crise grave pode persistir por semanas. Para proporcionar alívio para o paciente, analgésicos não narcóticos, narcóticos e adjuvantes são usados sozinhos ou em combinação.

A gravidade e a duração da dor determinam o regime analgésico mais apropriado. Opioides administrados por via parenteral (morfina, hidromorfona, meperidina) são frequentemente usados para o tratamento da dor grave nas crises vaso-oclusivas. Vários estudos recentes sugerem outras opções para o paciente e para o médico: a infusão intravenosa contínua de um fármaco anti-inflamatório não esteroidal (cetorolaco) e a administração epidural contínua de anestésico local (lidocaína) e analgésico opioide (fentanil) diminuíram efetivamente a dor, que não respondia aos tratamentos convencionais. Além da analgesia, também foi iniciada a terapia com oxigênio.



Quadro de teste clínico

Contagem sanguínea completa

A contagem sanguínea completa (CSC) fornece informações sobre as populações celulares sanguíneas e suas características. Os dados são obtidos de amostras de sangue total por meio de análise hematológica automatizada. Alguns instrumentos também fornecem diferencial de leucócitos, contagem de reticulócitos e morfologia de eritrócitos. Resultados típicos para um indivíduo e a variação de referência são mostrados na Tabela 5.2.

Resumo

- Este capítulo descreve duas proteínas importantes que interagem reversivelmente com o O_2: a mioglobina (Mb), uma proteína de armazenamento de oxigênio no tecido e a hemoglobina (Hb), uma proteína de transporte de oxigênio no sangue. Ambas utilizam um domínio polipeptídico que contém heme para sequestrar O_2 e aumentar sua solubilidade.
- Como um tetrâmero de globinas, a Hb é um dos exemplos mais bem caracterizados de cooperatividade nas interações com o ligante.
- Com sua série de moléculas efetoras, a Hb é também um protótipo de proteínas e enzimas alostéricas.
- O 2,3-bifosfoglicerato é um importante efetor alostérico da Hb, diminuindo a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio; essa é uma importante adaptação à altitude elevada e na doença pulmonar. Os prótons, por meio do efeito de Bohr, assim como o

CO_2, também promovem a liberação do oxigênio da hemoglobina no tecido periférico. Alterações conformacionais tanto na estrutura terciária quanto na estrutura quaternária caracterizam a transição entre os estados desoxigenado e oxigenado.

- Mutações nos genes das globinas levam a um espectro de variantes estruturais e funcionais, das quais algumas são patogênicas, como a HbS, que causa anemia falciforme.

Questões para aprendizagem

1. Discuta por que algumas mutações genéticas na α-globina ou na β-globina resultam em um fenótipo patológico, enquanto a maioria permanece silenciosa ou benigna. Descreva as mutações mais difíceis de detectar.
2. Reflita sobre os mecanismos por meio dos quais um adulto com anemia falciforme se beneficiaria com um nível de hemoglobina fetal (HbF) de 20%.
3. Muitos carreadores de oxigênio à base de hemoglobina (HBOC) têm sensibilidade diminuída ao pH e suscetibilidade à oxidação aumentada. Discuta as consequências de um efeito Bohr reduzido para liberação de oxigênio na periferia, equilíbrio acidobásico tecidual e transporte de CO_2 para os pulmões.
4. Resuma as observações de animais experimentais nas quais o gene que codifica a mioglobina tenha sido silenciado *(knocked out)*.

Leituras sugeridas

Allen, B. W., Stamler, J. S., Piantadosi, C. A. Hemoglobin, nitric oxide and molecular mechanisms of hypoxic vasodilation. *Trends Mol Med*. 2009; 15:452–460.

Bauer, I., Pannen, B. H. Bench-to-bedside review: Carbon monoxide – from mitochondrial poisoning to therapeutic use. *Crit Care*. 2009; 13:220.

Jahr, J. S., Akha, A. S., Holtby, R. J. Crosslinked, polymerized, and PEG-conjugated hemoglobin-based oxygen carriers: clinical safety and efficacy of recent and current products. *Curr Drug Discov Technol*. 2012; 9:158–165.

Kutlar, F. Diagnostic approach to hemoglobinopathies. *Hemoglobin*. 2007; 31:243–250.

Malowany, J. I., Butany, J. Pathology of sickle cell disease. *Semin Diagn Pathol*. 2012; 29:49–55.

Skold, A., Cosco, D. L., Klein, R. Methemoglobinemia: pathogenesis, diagnosis, and management. *South Med J*. 2011; 104:757–761.

Thein, S. L. Milestones in the history of hemoglobin research. *Hemoglobin*. 2011; 35:450–462.

Vogt, M., Hoppeler, H. Is hypoxia training good for muscles and exercise performance? *Prog Cardiovasc Dis*. 2010; 52:525–533.

Winslow, R. M. Oxygen: the poison is in the dose. *Transfusion*. 2012. [doi: 10.1111/j.1537-2995.2012.03774.x].

Sites

The Red Cell and Anemia (detailed five-part presentation by pathologist E Uthman): Blood cells and the CBC: http://web2.airmail.net/uthman/blood_cells.html

Anemia: Pathophysiologic Consequences, Classification, and Clinical Investigation: http://web2.airmail.net/uthman/anemia/anemia.html

Nutritional Anemias and Anemia of Chronic Disease: http://web2.airmail.net/uthman/nutritional_anemia/nutritional_anemia.html

Hemolytic Anemias: http://web2.airmail.net/uthman/hemolytic_anemia/hemolytic_anemia.html

Hemoglobinopathies and Thalassemias: http://web2.airmail.net/uthman/hemoglobinopathy/hemoglobinopathy.html
Sickle Cell Information Center (comprehensive site for both patients and professionals): www.scinfo.org/

Animações:

Interactive examination (Jmol format) of hemoglobin and heme structures, binding of oxygen, and impact of sickle cell disease mutation. Molecular Visualization Resources, University of Massachusetts: www.umass.edu/molvis/tutorials/hemoglobin

Teaching Cases, American Society of Hematology: teachingcases.hematology.org

CAPÍTULO 6

Proteínas Catalisadoras – Enzimas

Junichi Fujii

Objetivos

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever as características das reações enzimáticas do ponto de vista da energia livre, do equilíbrio e da cinética.
- Discutir a estrutura e a composição das enzimas, incluindo o papel dos cofatores e das condições que afetam as reações enzimáticas.
- Descrever a cinética enzimática com base na equação de Michaelis-Menten e no significado da constante de Michaelis (K_m).
- Descrever os elementos da estrutura da enzima que explicam sua especificidade pelo substrato e sua atividade catalítica.
- Descrever os mecanismos reguladores que afetam as reações enzimáticas, inclusive a regulação por efetores alostéricos e por modificação covalente.
- Diferenciar entre os principais tipos de inibição enzimática do ponto de vista da cinética enzimática.
- Discutir o uso terapêutico de inibidores de enzimas e a utilidade dos ensaios enzimáticos clínicos para o diagnóstico.

Introdução

Quase todas as funções biológicas são mantidas por reações químicas catalisadas por catalisadores biológicos, chamados enzimas

Um metabolismo eficiente é controlado por vias metabólicas ordenadas, consecutivas e ramificadas. As enzimas aceleram as reações químicas sob condições fisiológicas. Uma enzima, entretanto, não pode alterar o equilíbrio de uma reação; ela pode somente acelerar a velocidade da reação pela diminuição da energia de ativação necessária

(Fig. 6.1). A regulação das atividades das enzimas possibilita a adaptação do metabolismo a condições que mudam rapidamente. **Quase todas as enzimas são proteínas**, mas algumas moléculas de ácidos ribonucleicos, denominadas ribozimas, também têm atividade catalítica (Cap. 32). Com base na análise do genoma humano, estima-se que cerca de 1/4 dos genes humanos codifique enzimas que catalisam reações metabólicas.

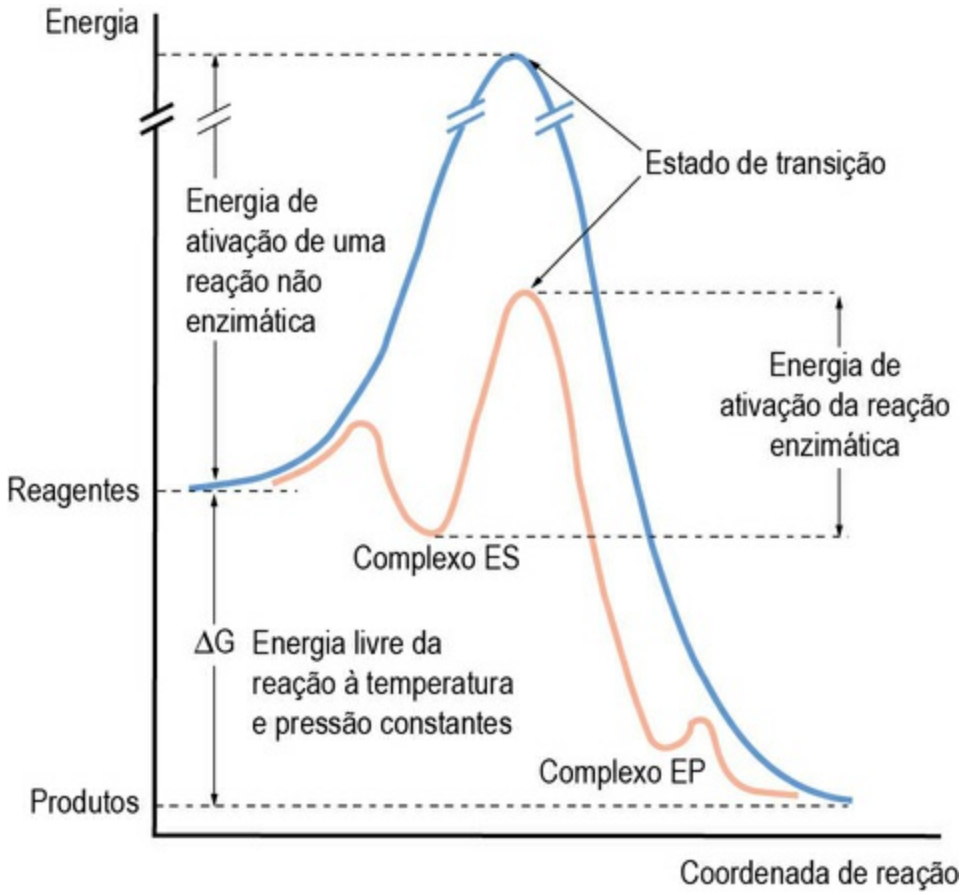


FIG. 6.1 Perfil das reações enzimáticas e não enzimáticas. Os princípios básicos de uma reação catalisada por enzimas são os mesmos que os de quaisquer outras reações químicas. Quando uma reação química acontece, o substrato deve ganhar energia de ativação para alcançar um ponto chamado de estado de transição da reação, no qual o nível de energia é máximo. Uma vez que o **estado de transição** de uma reação catalisada por enzima tem um nível mais baixo de energia que o da reação não catalisada, a reação da enzima ocorre mais rapidamente. Complexo ES, complexo enzima substrato; complexo EP, complexo enzima-produto.

Reações enzimáticas

Fatores que afetam as reações enzimáticas

Efeito da temperatura

As enzimas têm uma temperatura ótima, na qual funcionam de modo mais eficaz

No caso de um catalisador inorgânico, a velocidade da reação aumenta com a temperatura do sistema, e a elevação da temperatura pode ser usada para acelerar a reação. Enzimas, por outro lado, geralmente funcionam como catalisadoras à

temperatura (do ambiente ou do corpo) constante. Em ensaios *in vitro*, contudo, a atividade de uma enzima aumenta com a temperatura, mas declina depois em temperaturas mais elevadas. Isso acontece porque elas, assim como todas as proteínas, desnaturam em altas temperaturas e perdem atividade.

Efeito do pH

Cada enzima tem um ótimo de pH porque aminoácidos ionizáveis, tais como histidina, glutamato e cisteína, participam das reações catalíticas

Enzimas citosólicas contêm ótimos de pH na faixa de 7-8. A pepsina, que é secretada pelas células gástricas e funciona no suco gástrico, tem um ótimo de pH de 1,5-2,0; a tripsina e a quimotripsina contêm um pH ótimo alcalino, coerente com sua atividade digestiva no suco pancreático alcalino; enzimas lisossomais têm pH ótimo geralmente ácido. A sensibilidade das enzimas ao pH resulta do efeito do pH sobre a carga iônica das cadeias laterais dos aminoácidos das enzimas. Vários solutos (incluindo substratos, produtos, íons metálicos e moléculas reguladoras) também afetam a velocidade das reações enzimáticas.

Definição de atividade enzimática

Uma unidade internacional (UI) de enzima catalisa a conversão de 1 μmol de substrato em produto por minuto

Para efeito de padronização, a atividade de uma enzima é medida sob condições definidas (temperatura, pH, tampão, concentrações de substrato e de coenzima). A velocidade (v) de uma reação enzimática sob essas condições é definida como a velocidade de conversão do substrato em produto por unidade de tempo. Uma unidade de enzima é uma medida da quantidade da enzima presente. A UI comumente usada é a quantidade de enzima que catalisa a transformação de um micromol de substrato em produto por min (1 UI = 1 μmol/min). O **katal** é uma unidade internacional para a quantidade de enzima que catalisa a conversão de 1 mol do substrato em 1 mol de produto por segundo (1 kat = 1 mol/s). Pelo fato de o katal ser um número geralmente muito pequeno, a unidade internacional, muito maior, é mais comumente usada como a unidade padrão de atividade.

A atividade específica de uma enzima é uma medida do número de UI/mg de proteína

A atividade específica de uma enzima, uma medida da atividade por quantidade de proteína, é expressa como μmol/min/mg de proteína ou por UI/mg de proteína. As atividades específicas das enzimas variam largamente entre os tecidos conforme a função metabólica do tecido. As enzimas para a síntese do colesterol, por exemplo, têm atividade específica mais alta (UI/mg de tecido) no fígado que no músculo, o que é coerente com o papel do fígado na biossíntese do colesterol. A atividade específica de uma enzima é útil para estimar a sua pureza – quanto maior a atividade específica de

uma enzima, maior sua pureza e homogeneidade.

A especificidade de reação e do substrato

A maioria das enzimas é altamente específica, tanto para o tipo de reação que catalisa como para a natureza do(s) substrato(s)

A reação que a enzima catalisa é quimicamente determinada pelos resíduos de aminoácidos presentes no centro catalítico da enzima. Em geral, o local ativo de uma enzima é composto pelo local de ligação do substrato e pelo local catalítico. A especificidade do substrato é determinada a partir do tamanho, estrutura, cargas, polaridade e caráter hidrofóbico do local de ligação do substrato. Isso decorre de o substrato ter de se ligar no local ativo na primeira etapa da reação, o que estabelece o palco para que ocorra a catálise. Enzimas altamente específicas como a catalase, que degrada a H_2O_2, e a urease, que degrada a ureia, catalisam somente uma única reação química, mas algumas enzimas têm especificidade mais ampla. As serinaproteases são um exemplo típico de tal grupo. Elas são uma família de enzimas estreitamente relacionadas, tais como as enzimas pancreáticas, a quimotripsina, a tripsina e a elastase, todas com um resíduo reativo de serina no local catalítico; catalisam a hidrólise de ligações peptídicas no lado carboxila de um número limitado de aminoácidos em proteínas. Mesmo que elas apresentem estruturas e mecanismos catalíticos similares, as especificidades para seus substratos são muito diferentes em virtude das características estruturais dos seus locais de ligação (Fig. 6.2).

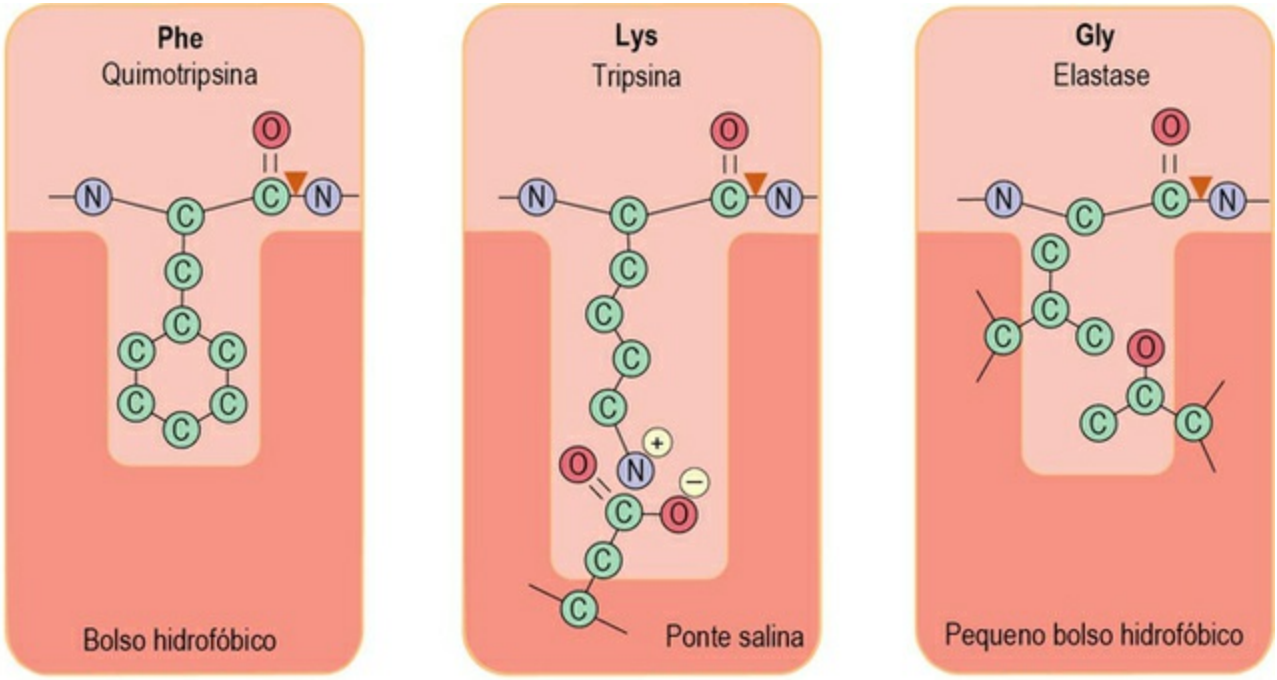


FIG. 6.2 Características dos locais de ligação do substrato nas serinaproteases quimotripsina, tripsina e elastase. Na quimotripsina, um bolso hidrofóbico liga resíduos de aminoácidos aromáticos, tais como fenilalanina (Phe). Na tripsina, a carga negativa do resíduo aspartato no local de ligação do substrato promove a quebra no lado carboxila dos resíduos de lisina (Lys) e da arginina (Arg) positivamente carregados. Na elastase, as cadeias laterais de uma valina e de uma treonina bloqueiam o local de ligação do substrato e possibilitam a ligação de aminoácidos com cadeias laterais pequenas ou sem cadeias laterais, tais como a glicina (Gly). ▼ local de hidrólise pela enzima.

A todas as enzimas atribui-se uma classificação enzimática (EC) de quatro dígitos para organizar as diferentes enzimas que catalisam as muitas milhares de reações. O primeiro dígito identifica a enzima como membro de uma das seis classes principais de enzimas apresentadas na Tabela 6.1. Os dois dígitos seguintes indicam as classes e as subclasses de substratos; o quarto dígito indica o número de série da enzima específica. Isozimas são enzimas que catalisam a mesma reação, mas que diferem na sua estrutura primária e/ou na composição de suas subunidades. Níveis de algumas enzimas tecido-específicas e isozimas são medidos no soro para estabelecer diagnósticos (Fig. 6.3 e Tabela 6.2).

Tabela 6.1

Classificação de enzimas

Classe	Reação	Enzimas
1. Oxidorredutases	$A_{red} + B_{ox} \rightarrow A_{ox} + B_{red}$	Desidrogenases, peroxidases
2. Transferases	A-B + C → A + B-C	Hexocinase, transaminases
3. Hidrolases	$A\text{-}B + H_2O \rightarrow A\text{-}H + B\text{-}OH$	Fosfatase alcalina, tripsina
4. Liases (sintases)	X-A-B-Y → A = B + XY	Fumarase, desidratases
5. Isomerases	$A \rightleftharpoons isoA$	Triose fosfato isomerase, fosfoglicomutase
6. Ligases (sintetases)	A + B + ATP → A-B + ADP + Pi	Piruvato carboxilase, DNA ligases

Tabela 6.2

Algumas enzimas usadas no diagnóstico clínico de doenças

Enzima	Fontes teciduais	Uso diagnóstico
AST	Coração, músculo esquelético, fígado, cérebro	Doença do fígado
ALT	Fígado	Doença do fígado (p. ex., hepatite)
Amilase	Pâncreas, glândula salivar	Pancreatite aguda, obstrução biliar
CK	Músculo esquelético, coração, cérebro	Distrofia muscular, infarto agudo do miocárdio
GGT	Fígado	Hepatite, cirrose
LDH	Coração, eritrócitos do fígado	Linfoma, hepatite
Lipase	Pâncreas	Pancreatite aguda, obstrução biliar
Fosfatase alcalina	Osteoblastos	Doenças dos ossos, tumores ósseos
Fosfatase ácida (PSA)	Próstata	Câncer da próstata

AST, aspartato aminotransferase, anteriormente conhecida como transaminase glutâmico-oxaloacética sérica (SGOT); ALT, alanina aminotransferase, anteriormente conhecida como transaminase glutâmico-pirúvica sérica (SGPT); CK, creatina fosfocinase; GGT, γ-glutamil transpeptidase; LDH, lactato desidrogenase; PSA, antígeno específico da próstata (calicreína 3).

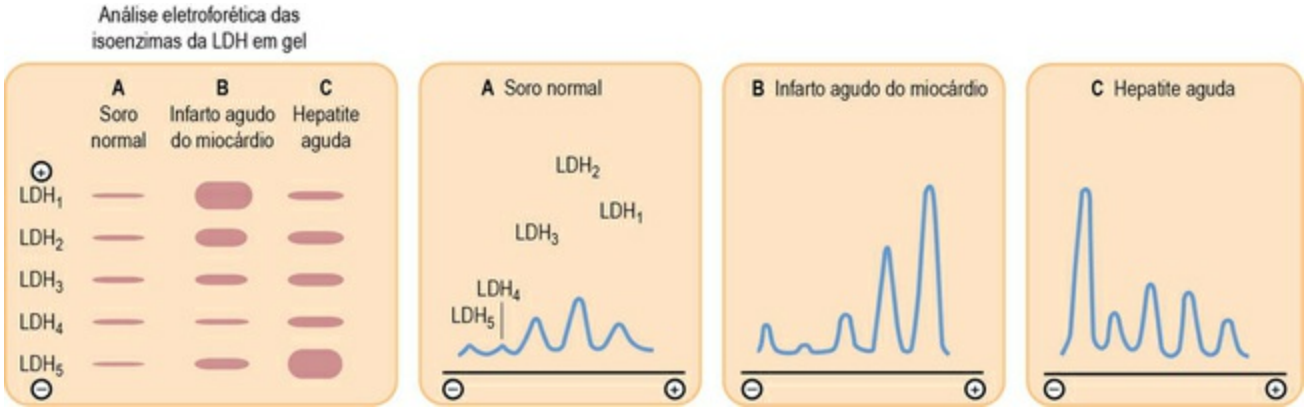


FIG. 6.3 Padrões densitométricos das isoenzimas de lactato desidrogenase (LDH) em soro de pacientes diagnosticados com infarto agudo do miocárdio ou hepatite aguda. Isoenzimas, diferindo ligeiramente na carga, são separadas por eletroforese em acetato de celulose, visualizadas usando um substrato cromogênico e quantificadas por densitometria. A atividade total de LDH no soro também está aumentada nesses pacientes. Uma vez que a hemólise libera LDH dos eritrócitos e afeta a distribuição de isozimas e o diagnóstico diferencial, as amostras de sangue devem ser tratadas com cuidado. As dosagens de LDH para o diagnóstico do infarto do miocárdio foram recentemente substituídas pelo ensaio da troponina plasmática e de outros biomarcadores.

Papel das coenzimas

Moléculas ajudantes, chamadas de coenzimas, desempenham uma parte essencial em reações catalisadas por enzimas

Enzimas ligadas a coenzimas covalentemente ou não são chamadas de **holoenzimas**; uma holoenzima sem uma coenzima é denominada **apoenzima.** Coenzimas são divididas em duas categorias. Coenzimas solúveis ligam-se de modo reversível à porção de proteína da enzima. Coenzimas são, frequentemente, modificadas durante a reação enzimática, depois se dissociam da enzima e são regeneradas por outra enzima; as oxidorredutases, apresentadas no Capítulo 9, contêm coenzimas que podem ser oxidadas por uma enzima e então reduzidas e recicladas por outra. Coenzimas (p. ex., coenzima A) ajudam no transporte de intermediários de uma enzima para a outra em uma sequência de reações. A maioria das coenzimas é derivada de vitaminas; por exemplo, os derivados do grupo das vitaminas B, niacina e riboflavina, agem como coenzimas em reações de oxidorredutases. A estrutura e a função das coenzimas serão descritas em capítulos seguintes. **Grupos prostéticos** são ligados às enzimas de modo firme, frequentemente por ligações covalentes, e permanecem ligados durante todo o ciclo catalítico. Algumas enzimas requerem, para a sua atividade, íons (metais) inorgânicos, frequentemente denominados **cofatores**. Por exemplo, as enzimas da coagulação sanguínea necessitam de Ca^{2+}, e as oxidorredutases usam ferro, cobre e manganês.

Cinética enzimática

A equação de Michaelis-Menten: um modelo simples de reação enzimática

As reações enzimáticas são por natureza reações de múltiplas etapas que ocorrem por muitas reações parciais

Em 1913, muito antes que a estrutura das proteínas fosse conhecida, Leonor Michaelis e Maud Leonora Menten desenvolveram um modelo simples para a cinética das reações catalisadas por enzimas (Fig. 6.4). O modelo de Michaelis-Menten tem por base que o substrato S se liga à enzima E, formando um intermediário obrigatório, o complexo enzima-substrato (ES), em que ocorrem, então, reações na superfície da molécula da enzima e, a seguir, decompõe-se em E + P (produto). O modelo assume que E, S e ES entram em equilíbrio rápido uns com os outros, tal que uma concentração de equilíbrio dinâmico de ES é rapidamente alcançada e a decomposição do complexo ES em E + P é a **etapa limitante** da catálise. A velocidade dessa reação depende diretamente da energia de ativação da reação catalisada pela enzima (Fig. 6.1).

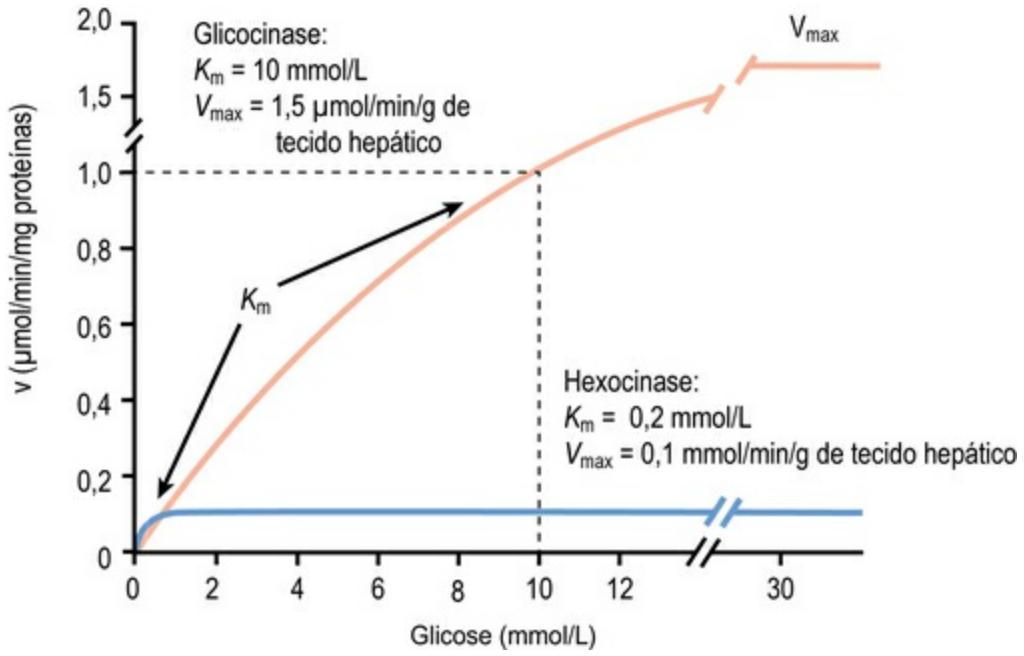


FIG. 6.4 Propriedades da glicocinase e da hexocinase. A glicocinase e a hexocinase catalisam a mesma reação, a fosforilação da glicose a glicose-6-fosfato (Glc-6-P). Elas mostram-se com diferentes propriedades cinéticas, têm distribuições teciduais diferentes e funções fisiológicas distintas.

Quadro de teste clínico

Especificidade TECIDUAL das isozimas de lactato desidrogenases

Uma mulher de 56 anos de idade foi admitida em unidade de tratamento intensivo. A paciente havia sofrido de febre baixa por uma semana, tinha alguma dor no peito e dificuldade para respirar há 24 horas. Nenhuma anormalidade foi encontrada na radiografia do tórax ou no eletrocardiograma. No entanto, um teste sanguíneo mostrou contagem de leucócitos de 12.100/mm^3 (normal: 4.000-9.000/mm^3), de eritrócitos de 240 × 10^4/mm^3 (normal: 380-500 × 10^4/mm^3), de hemoglobina de 8,6 g/dL (normal: 11,8-

16,0 g/dL), de lactato desidrogenase (LDH) de 1.400 UI/L (normal: 200-400 UI/L). Os níveis de outras enzimas estavam normais. Tomando por base os testes sanguíneos, o perfil das isozimas LDH e outros dados, a paciente foi finalmente diagnosticada com linfoma maligno.

Comentário

LDH é uma enzima tetramérica, composta de duas subunidades diferentes de 35 kDa. O coração contém o tipo H, os músculos esqueléticos e o fígado apresentam a subunidade do tipo M, que são codificadas por genes diferentes. Cinco tipos de isozimas tetraméricas podem ser formados a partir dessas subunidades: H_4 (LDH_1), H_3M_1 (LDH_2), H_2M_2 (LDH_3), H_1M_3 (LDH_4) e M_4 (LDH_5). Considerando que a distribuição de isozimas é diferente de tecido para tecido, é possível diagnosticar dano tecidual pelo ensaio da atividade total de LDH e, depois, pelo perfil das suas isozimas (Fig. 6.3).

Para valores hematológicos de referência, ver a Tabela 5.2 e o Apêndice 1.

Quadro de conceitos avançados

Proporção dos genes para enzimas no genoma humano inteiro

Os dados originais (Venter et al., Science 2001; 291:1335, 2001) são os citados aqui e, por isso, a classificação não combina exatamente com a nomenclatura da Tabela 6.2. Cerca de 1/4 dos genes codifica enzimas. Nomes de grupos de enzimas com número e proporção (porcentagem entre parênteses) de um total de 26.383 genes foram os seguintes: transferases, 610 (2,0); sintases e sintetases, 313 (1,0); oxidorredutases, 656 (2,1); liases, 117 (0,4); ligases, 56 (0,2); isomerases, 163 (0,5); hidrolases, 1.227 (4,0); cinases, 868 (2,8); enzimas dos ácidos nucleicos, 2.308 (7,5).

Quadro de teste clínico

Isozimas

Os perfis de isozimas são realizados frequentemente em laboratório clínico para diagnosticar doenças (Fig. 6.3) A definição de isozimas é frequentemente operacional; isto é, com base em métodos de ensaio simples e reprodutíveis específicos de substrato que, por vezes, não requerem um conhecimento preciso da estrutura da enzima.

O termo isozima é usado comumente para nos referirmos a: (1) variantes genéticas de uma enzima; (2) proteínas geneticamente independentes com pouca homologia; (3) heteropolímeros de duas ou mais cadeias polipeptídicas ligadas não covalentemente; (4) enzimas não relacionadas que catalisam reações similares, como as enzimas que se conjugam a diferentes grupos prostéticos ou que requerem diferentes coenzimas ou cofatores; (5) formas diferentes de uma única cadeia polipeptídica que podem mostrar, por exemplo, variações na composição de carboidratos, na desaminação de

aminoácidos ou em uma modificação proteolítica.

A constante catalítica, k^{cat}, também conhecida por número de modificações (ou *turnover*), é a constante de velocidade que descreve quão rapidamente uma enzima catalisa uma reação. **A k_{cat} é definida como a quantidade de molécula do substrato que pode ser transformada por uma molécula de enzima por unidade de tempo.** A proporção de ES em relação ao número total de moléculas de enzimas $[E]_t$, isto é, a razão $[ES]/[E]_t$, limita a velocidade de uma reação catalisada por enzima (ν), tal que:

$$v = k_{cat}[ES]$$

Desde que E, S e ES estejam em equilíbrio químico, a enzima atingirá a velocidade máxima, V_{max}, em concentrações altíssimas (saturantes) de substrato [S] quando $[ES] \approx [E]_t$ (enzima total). Assim:

$V_{max} = k_{cat}\,[E]_t$

Para a dissociação do complexo ES, a lei de ação das massas produz:

$$k_d = \frac{[E][S]}{[ES]}$$

Dado que:

$$[E]_t = [E] + [ES]$$

Pode-se mostrar que:

$$\frac{[ES]}{[E]_t} = \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

onde $k_{m=}k_d$

Consequentemente, a velocidade da reação enzimática, ν, é dada por:

$$v = \frac{K_{cat}[E]_t[S]}{K_m + [S]}$$

Desde que k_{cat} $[E]_t$ corresponde à velocidade máxima, V^{max}, que é alcançada em altas concentrações (saturantes) de substrato, obtém-se a equação de Michaelis-Menten:

$$v = V_{max} \cdot \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

A análise dessas equações indica que a constante de Michaelis, K_m, é expressa em unidades de concentração e corresponde à concentração de substrato na qual ν é 50% da velocidade máxima; isto é, [ES] = ½ $[E]_t$ e ν = V_{max}/2 (Fig. 6.4).

A K_m é uma constante útil para estimar a afinidade de uma enzima por seu substrato. Enzimas com elevada K_m requerem alta concentração de substrato para uma atividade eficiente, enquanto aquelas com baixa K_m operam eficientemente com quantidades mínimas de substrato.

Quadro de conceitos avançados

Glicocinase e hexocinase

A **hexocinase** catalisa a primeira etapa do metabolismo da glicose em todas as células, que é a reação de fosforilação da glicose pelo trifosfato de adenosina (ATP) para formar glicose 6-fosfato (Glc-6-P):

$$\text{Glicose} + \text{ATP} = \text{glicose 6} - \text{fosfato} + \text{ADP}$$

Essa enzima tem uma K_m baixa para glicose (0,2 mmol/L) e sofre inibição alostérica pelo produto, a Glc-6-P. Uma vez que os níveis normais de glicose no sangue estão em torno de 5 mmol/L e os níveis intracelulares ao redor de 0,2-2 mmol/L, a hexocinase catalisa eficientemente essa reação (50-90% da V_{max}) sob condições normais (p. ex., no músculo).

Os hepatócitos, que estocam glicose sob a forma de glicogênio, e as células β do pâncreas, que regulam (por secretarem insulina) o consumo de glicose nos tecidos e seu armazenamento no fígado contêm uma isozima chamada glicocinase.

A **glicocinase** catalisa a mesma reação que a hexocinase, mas tem uma K_m muito

maior para a glicose (10 mmol/L) e não é inibida pelo produto, Glc-6-P. Como a glicocinase tem uma K_m maior que a hexocinase, a glicocinase fosforila a glicose com eficiência crescente à medida que os níveis de glicose do sangue aumentam depois de uma refeição (Fig. 6.4). Um dos papéis fisiológicos da glicocinase no fígado é fornecer Glc-6-P para a síntese de glicogênio, uma forma de reserva de glicose. Nas células β do pâncreas, a glicocinase funciona como um sensor de glicose, determinando o limiar para a secreção de insulina. Camundongos carentes de glicocinase nas células β do pâncreas morrem de profunda hiperglicemia após 3 dias de nascidos, devido a uma falha na secreção de insulina.

O modelo de Michaelis-Menten baseia-se nos pressupostos:

- E, S e ES estão em equilíbrio rápido
- Não há formas de enzima presentes que não sejam E e ES
- A conversão de ES em E + P é a etapa irreversível, limitante de velocidade. Mesmo que todas as reações catalisadas por enzimas sejam teoricamente reversíveis, as velocidades iniciais são as normalmente medidas; isto é, quando a concentração de produtos e a velocidade da reação reversa são desprezíveis.

Tipos de modelos cinéticos similares foram desenvolvidos para descrever a cinética de enzimas com mais de um substrato e mais de um produto (cinética multissubstrato e multiproduto).

O uso dos gráficos de Lineweaver-Burk e Eadie-Hofstee

Análises gráficas alternativas possibilitam determinação mais exata da K_m e da V_{max} de uma enzima

Em um gráfico da velocidade de reação *versus* a concentração de substrato, a velocidade da reação se aproxima da velocidade máxima (V_{max}) de modo assintótico (Fig. 6.5A); por isso, torna-se difícil obter por simples extrapolação valores precisos para a V_{max} e, consequentemente, para a K_m (concentração de substrato necessária para metade da velocidade máxima). Para resolver esse problema, foram desenvolvidas algumas transformações lineares da equação de Michaelis-Menten.

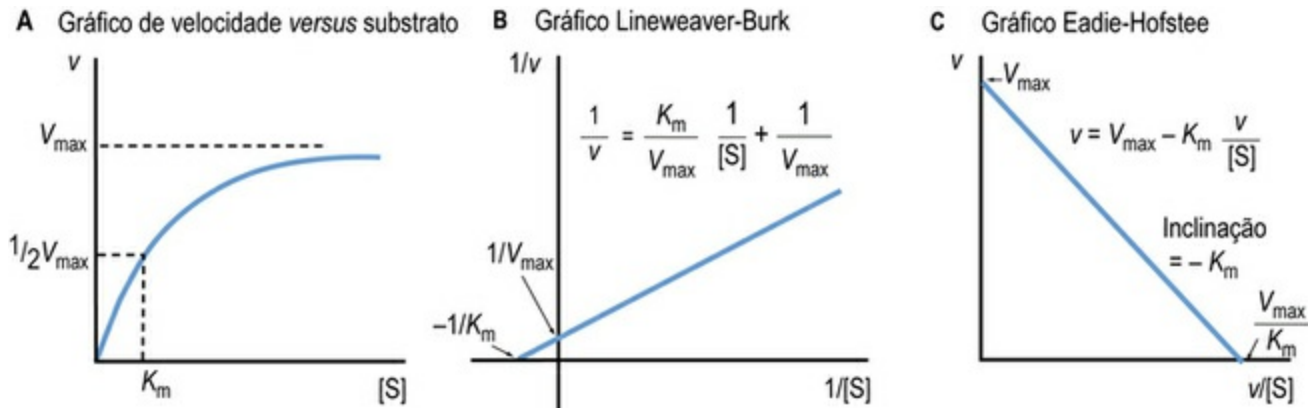


FIG. 6.5 Gráficos de cinética enzimática. Representações cinéticas das propriedades das enzimas. **(A)** Gráfico Michaelis-Menten de velocidade (v) *versus* concentração de substrato ([S]). **(B)** Gráfico Lineweaver-Burk. **(C)** Gráfico Eadie-Hofstee.

Gráfico Lineweaver-Burk

O gráfico Lineweaver-Burk, ou duplo recíproco, é obtido tomando-se o inverso da equação de Michaelis-Menten (Fig. 6.5B). Pelo rearranjo da equação, obtemos:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]}$$

Essa equação produz uma reta (y = mx + b), sendo y = 1/v, x = 1/[S], m = inclinação e b = interseção em y. Assim, um gráfico de 1/v *versus* 1/[S] (Fig. 6.5B) tem uma inclinação de K_m/V_{max}, uma interseção no eixo 1/v igual a $1/V_{max}$ e uma interseção no eixo 1/[S] igual a $-1/K_m$. Mesmo que o gráfico Lineweaver-Burk seja muito usado para análises cinéticas, devido ao fato de que são usados os inversos, um erro experimental pequeno pode resultar em um grande erro nos valores da K_m e da V_{max} graficamente determinados. Outra desvantagem é que dados importantes obtidos em altas concentrações de substrato terão seus inversos aglomerados dentro de uma estreita faixa próxima ao eixo 1/v.

Gráfico Eadie-Hofstee

Um segundo gráfico de forma linear da equação de Michaelis-Menten, amplamente usado, é o gráfico Eadie-Hofstee (Fig. 6.5C), descrito pela equação:

$$v = V_{max} - K_m \times \frac{v}{[S]}$$

Nesse caso, um gráfico de v *versus* v/[S] tem no eixo y (interseção de v) o valor da V_{max},

uma interseção no eixo x (v/[S]) de V_{max}/K_m e uma inclinação de $-K_m$. O gráfico Eadie-Hofstee não aglomera os valores das concentrações elevadas de substrato.



Quadro de teste clínico

Medidas de atividade de enzimas em amostras clínicas

Nos laboratórios clínicos, a atividade enzimática é medida na presença de concentrações saturantes de substrato(s) e coenzimas. As velocidades iniciais são anotadas para minimizar os erros que resultam da reação reversa. Sob essas condições, $v \approx V_{max}$, e a atividade são diretamente proporcionais à concentração de enzima. A quantidade de enzima (atividade enzimática) é comumente expressa como UI/mL de plasma, soro ou líquido cerebroespinal, em vez de por mg de proteínas. Para comparações entre laboratórios, as condições para os ensaios devem ser obrigatoriamente padronizadas, por exemplo, pela especificação das concentrações de substrato e coenzima usadas, das substâncias do tampão, da concentração do tampão, das espécies iônicas, da força iônica, do pH e da temperatura.

A maioria das amostras clínicas é coletada em jejum, o que assegura medidas consistentes dos constituintes cujas concentrações podem variar diuturnamente e de outros, como glicose e lipídios, que podem se alterar em resposta à ingestão de alimentos. Amostras ricas em lipídios (lipidêmicas) mostram-se turvas e podem produzir dados não confiáveis por métodos espectrofotométricos e fluorométricos. Para evitar esses problemas, as amostras clínicas devem ser deslipidadas, frequentemente por extração com solvente orgânico.

Mecanismos de ação das enzimas

As reações enzimáticas envolvem grupos funcionais em enzimas, coenzimas, substratos e produtos

As enzimas variam significativamente em seu mecanismo de ação. Em alguns casos, a catálise é realizada no substrato, de modo não covalente, reversivelmente ligado à enzima. Em outros casos, um intermediário covalente é formado na superfície da enzima e depois liberado da enzima. Pode acontecer que toda a ação ocorra sobre uma coenzima que forma uma ligação covalente com o substrato. Os mecanismos de ação de muitas enzimas serão discutidos em capítulos posteriores.

As serinaproteases, apresentadas na Figura 6.2, representam bem aquelas enzimas que formam um intermediário covalente com seus substratos. Essas enzimas clivam as ligações peptídicas nas proteínas e, assim como em todas as reações enzimáticas, grupos funcionais das cadeias laterais dos aminoácidos participam da catálise. Na família das serinaproteases, uma serina do local ativo catalisa a clivagem da ligação peptídica. O grupo funcional da serina, um álcool primário, não está dentre os grupos funcionais mais reativos da química orgânica. Para aumentar sua atividade nas serinaproteases, esse

resíduo de serina faz parte de uma "tríade catalítica", no caso da quimotripsina: Asp^{102}, His^{57} e Ser^{195} (Fig. 6.6). Interações de ligações de hidrogênio em concerto entre esses aminoácidos aumentam a característica nucleofílica da serina, tal que ela pode atacar o átomo de carbono da carbonila da ligação peptídica do substrato. A quimotripsina é específica para clivar no lado carboxila das ligações peptídicas de que participam aminoácidos aromáticos, tais como a fenilalanina. Esse mecanismo de reação enzimático está esboçado na Figura 6.7, que mostra a formação e a clivagem de um intermediário ligado à enzima.

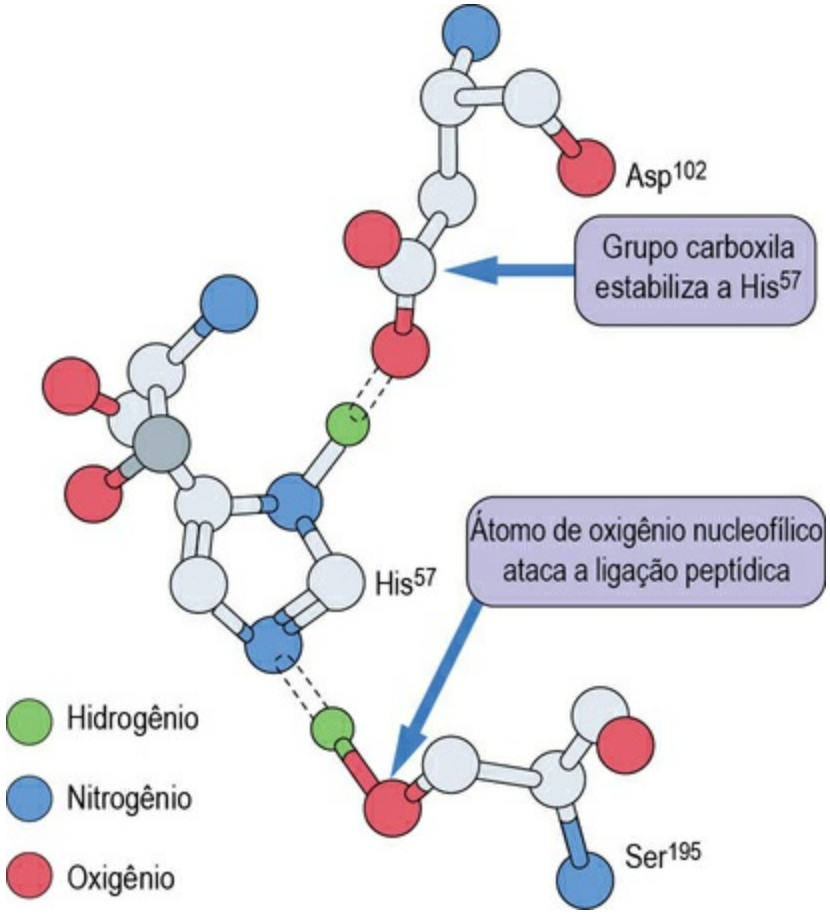


FIG. 6.6 Modelo esquemático de uma tríade catalítica de serinaprotease.

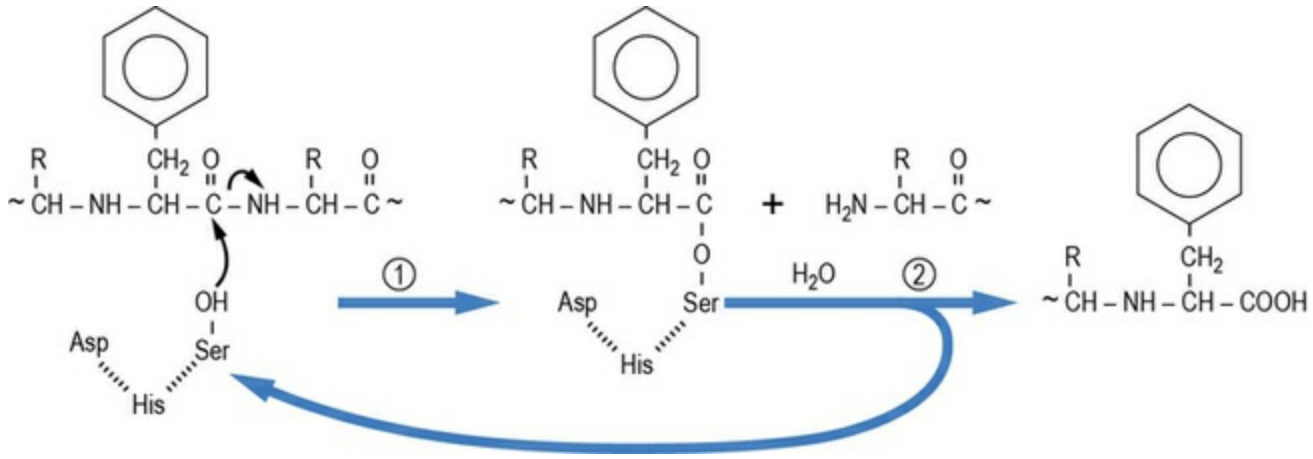


FIG. 6.7 Mecanismo de ação da quimotripsina. O resíduo de serina do local ativo ataca o grupo carbonila da ligação peptídica no lado carboxila de um resíduo de fenilalanina. O peptídio carboxiterminal é liberado e o peptídio aminoterminal fica como um intermediário ligado à enzima – o peptídio aminoterminal ligado covalentemente através de sua fenilalanina do terminal carboxila, esterificada com o resíduo de serina do local ativo. A ligação éster é hidrolisada em uma segunda etapa da reação para liberar o peptídio aminoterminal e recompor a enzima ativa.

Tripsina e elastase, outras duas enzimas digestivas com especificidades para aminoácidos diferentes (Fig. 6.2), são similares à quimotripsina em muitos aspectos. Cerca de 40% das sequências dessas três enzimas são idênticas, e suas estruturas tridimensionais são muito similares. As três enzimas contêm a tríade catalítica aspartato-histidina-serina e são inativadas por reação de fluorofosfatos com a serina do local ativo. O gás dos nervos, **di-isopropilfluorofosfato**, forma um éster serina-di-isopropilfluorofosfato estericamente impedido, que é lentamente hidrolisado e inibe as proteases da serina.

Inibição enzimática

Dentre as numerosas substâncias que afetam os processos metabólicos, os inibidores enzimáticos são particularmente importantes. Muitas drogas, tanto as de ocorrência natural quanto as sintéticas, agem como inibidores enzimáticos. Os metabólitos desses compostos podem também inibir a atividade enzimática. A maioria dos inibidores age de modo reversível, mas existem também os inibidores irreversíveis, que modificam permanentemente a enzima em que se ligam. A partir do uso de gráficos Lineweaver-Burk, é possível distinguir três tipos de inibição reversível: competitiva, acompetitiva e não competitiva.

Inibidores competitivos causam aumento aparente da K_m sem alteração da V_{max}

Uma enzima pode ser inibida competitivamente por substâncias cuja estrutura química seja semelhante àquela do substrato. Esses compostos ligam-se ao local ativo e competem com o substrato por esse local ativo: eles provocam aumento aparente na K_m, mas nenhuma mudança na V_{max} (Fig. 6.8). A inibição não é resultado de um efeito sobre a atividade enzimática, mas sobre o acesso do substrato ao centro ativo. O esquema reacional para a inibição competitiva é:

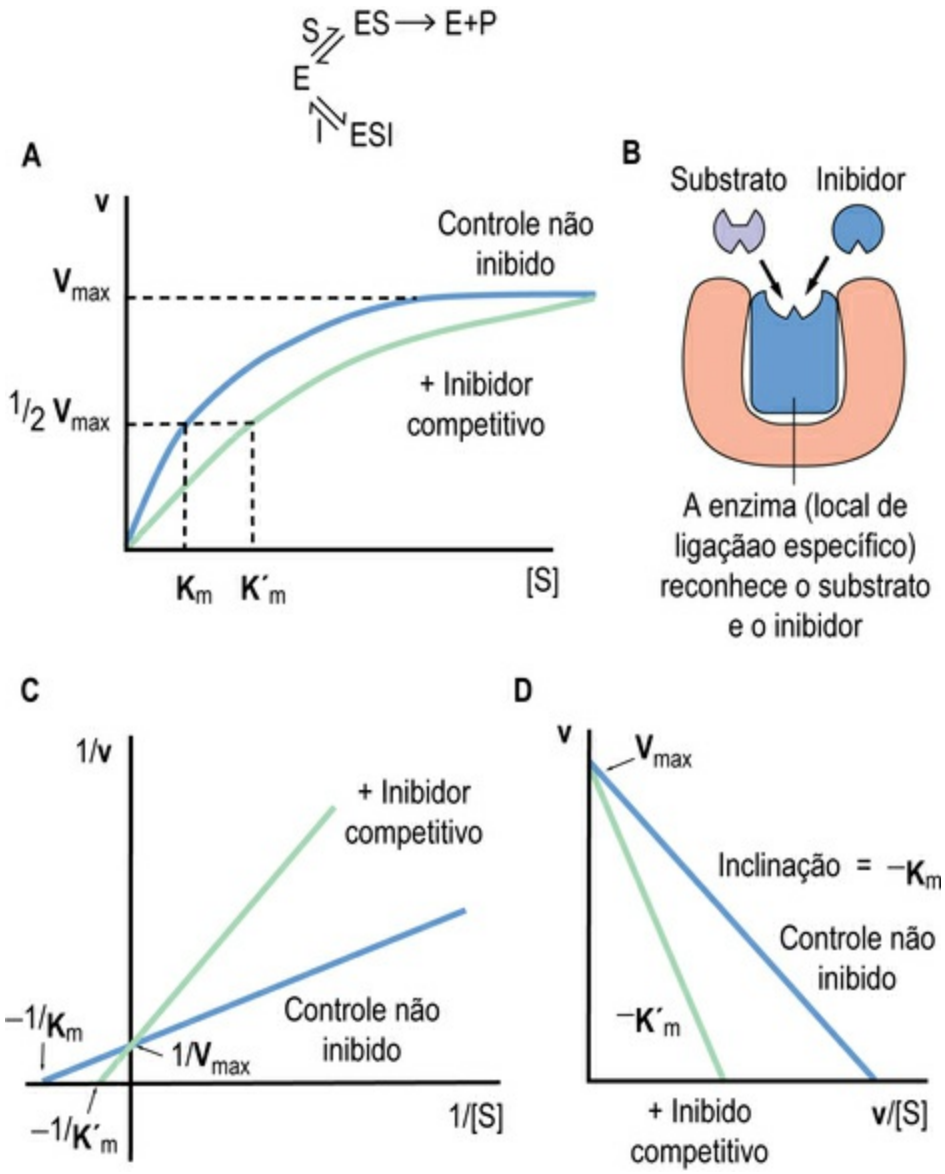


FIG. 6.8 Inibição enzimática competitiva. **(A)** Gráfico de velocidade *versus* concentração de substrato. **(B)** Mecanismo da inibição competitiva. **(C)** Gráfico Lineweaver-Burk na presença de um inibidor competitivo. **(D)** Gráfico Eadie-Hofstee na presença de um inibidor competitivo. K'_m é a K_m aparente na presença do inibidor.

$$E \begin{matrix} +^{S \rightleftharpoons ES \rightarrow E+P} \\ +_{I \rightleftharpoons EI} \end{matrix}$$

A constante de inibição (K_i) é a constante de dissociação do complexo enzima-inibidor (EI) e, quanto menor for o valor de K_i, mais eficiente será a inibição da atividade enzimática. A despeito do valor da K_i, entretanto, **a velocidade de uma reação catalisada por enzima na presença de inibidor competitivo pode ser aumentada pelo crescimento da concentração do substrato**, visto que o substrato, em altas concentrações, compete mais efetivamente com o inibidor.

Os inibidores não competitivos causam uma diminuição aparente na V_{max}

Um inibidor acompetitivo liga-se somente ao complexo enzima-substrato e nunca à enzima livre. A equação a seguir mostra o esquema de reação da inibição acompetitiva. Nesse caso, K_i é a constante de dissociação do complexo enzima-substrato-inibidor (ESI).



Quadro clínico

Tratamento com um inibidor da enzima conversora da angiotensina (ECA)

Um homem de 50 anos foi internado referindo fadiga generalizada, rigidez no ombro e dor de cabeça. O paciente media 1,80 m e pesava 84 kg. Sua pressão sanguínea era de 196/98 mmHg (normal abaixo de 140/90 mmHg, sendo a ideal abaixo de 120/80 mmHg) e a sua pulsação era de 74. Foi diagnosticado como hipertenso. O paciente foi medicado com captopril, um inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA). Depois de tratamento por 5 dias, sua pressão sanguínea retornou para níveis próximos do normal.

Comentário

A renina nos rins converte o angiotensinogênio em angiotensina I, que é então proteoliticamente clivada para produzir angiotensina II pela ECA. A angiotensina II aumenta a retenção de fluidos e eletrólitos pelos rins, o que contribui para a hipertensão. Assim, a inibição da ECA é um importante alvo para o tratamento da hipertensão. O captopril inibe a ECA competitivamente, diminuindo a pressão sanguínea (Cap. 23).



Quadro clínico

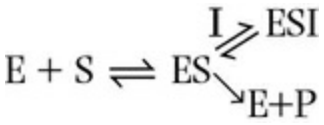
O envenenamento por metanol pode ser tratado com administração de etanol

Um homem de 46 anos deu entrada na emergência 7 h depois de consumir grande quantidade de bebida alcoólica falsificada. Ele não enxergava claramente e reclamava de dores no abdome e nas costas. Os resultados do laboratório indicaram acidose metabólica grave e osmolalidade sérica de 465 mmol/kg (faixa de referência de 285-295 mmol/kg) e nível de metanol no soro de 4,93 g/L (156 mmol/L!). Com tratamento intensivo, incluindo infusão venosa de etanol e bicarbonato, além de hemodiálise, ele sobreviveu e recuperou a visão.

Comentário

O envenenamento por metanol é incomum, mas extremamente danoso. O envenenamento por etilenoglicol é mais comum e exibe características clínicas similares. O sintoma inicial mais importante de envenenamento por metanol é perturbação visual. As evidências laboratoriais de envenenamento por metanol incluem acidose metabólica grave e aumento da concentração do soluto (metanol) no

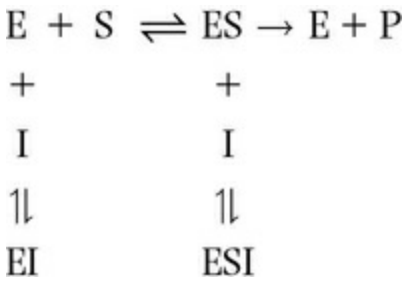
plasma. O metanol é vagarosamente metabolizado até formaldeído, que é então rapidamente convertido em formato por álcool desidrogenase. O formato acumula durante a intoxicação por metanol e é responsável pela acidose metabólica nos primeiros estágios da intoxicação. Em estágios mais avançados, o lactato também pode acumular como resultado da inibição da respiração pelo formato. O etanol é metabolizado por álcool desidrogenase, que pode se ligar ao etanol com muito mais afinidade do que se liga ao metanol ou ao etilenoglicol. Assim, o etanol é um agente útil para inibir competitivamente a transformação metabólica do metanol e do etilenoglicol em metabólitos tóxicos. O etilenoglicol ou o metanol que não foi metabolizado é gradualmente excretado na urina. Pronto tratamento com etanol, juntamente com bicarbonato para combater a acidose e a hemodiálise para remover o metanol e seus metabólitos tóxicos, enseja um bom prognóstico.



O inibidor causa um decréscimo na V_{max} porque uma fração do complexo enzima-substrato é desviada pelo inibidor para formar o complexo ESI inativo. A ligação do inibidor e o aumento da concentração do complexo ESI podem também afetar a dissociação do substrato, causando um decréscimo aparente da K_m; isto é, um aumento aparente da afinidade da enzima pelo substrato.

Os inibidores não competitivos podem se ligar a pontos fora do local ativo e alterar tanto a K_m como a V_{max} da enzima

Um inibidor não competitivo pode ligar-se tanto à enzima livre quanto ao complexo enzima-substrato. Os inibidores não competitivos exibem efeitos mais complexos e podem alterar tanto a K_m como a V_{max} de uma reação enzimática. A equação a seguir demonstra o esquema reacional observado na inibição não competitiva.



Muitos fármacos e venenos inibem enzimas irreversivelmente

Prostaglandinas são mediadores inflamatórios-chave. Sua síntese é iniciada por oxidação, mediada pela ciclo-oxigenase, e formação de um ciclo na estrutura do araquidonato sob

condições inflamatórias (Cap. 40). Os compostos supressores da ciclo-oxigenase apresentam atividade anti-inflamatória. A **Aspirina®** (ácido acetilsalicílico) inibe a atividade da ciclo-oxigenase ao acetilar sua Ser^{530}, o que bloqueia o acesso do araquidonato ao local ativo da enzima. Outros **fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (AINES)**, como a indometacina, inibem a ciclo-oxigenase pelo bloqueio do local de ligação do araquidonato.

O dissulfiram **(Antabuse®)** é um fármaco usado para o tratamento do alcoolismo. O álcool é metabolizado em duas etapas até formar ácido acético. A primeira enzima, a álcool desidrogenase, produz acetaldeído, que é então convertido em ácido acético por aldeído desidrogenase. Esta última tem no local ativo um resíduo de cisteína que é irreversivelmente modificado pelo dissulfiram, o que resulta em acumulação de álcool e acetaldeído no sangue. As pessoas que ingerem dissulfiram ficam nauseadas devido ao acúmulo de álcool e acetaldeído no sangue e demais tecidos, o que leva à abstinência alcoólica.

Agentes alquilantes como a iodoacetamida (ICH_2CONH_2) inibem irreversivelmente a atividade catalítica de algumas enzimas por modificação de resíduos essenciais de cisteína. **Metais pesados**, tais como sais de mercúrio e chumbo, também inibem enzimas com locais ativos que contêm grupos sulfidrila. Os adutos de mercúrio podem ser desfeitos por compostos contendo tiol. Ovos ou clara de ovos são eventualmente administrados como antídotos para ingestão acidental de metais pesados; a proteína da clara de ovo, a ovalbumina, é rica em grupos sulfidrila, capta os íons de metais livres e evita a absorção deles no trato gastrintestinal.

Em muitos casos, os inibidores irreversíveis são usados para identificar resíduos de locais ativos envolvidos na catálise enzimática e para aprofundar mais os conhecimentos sobre o mecanismo de ação de uma enzima. Por meio de sequenciamento ou análise espectrométrica do peptídio modificado, é possível identificar o aminoácido que foi especificamente afetado pelo inibidor e que toma parte na catálise.

Quadro de conceitos avançados

Inibição de enzimas: inibição do estado de transição e substrato suicida

As enzimas catalisam reações porque induzem o estado de transição da reação. Logo, deve ser possível construir moléculas que se ligam muito fortemente à enzima se a sua estrutura mimetizar o estado de transição do substrato. Os estados de transição em si não podem ser isolados porque eles não são um arranjo estável de átomos e porque algumas de suas ligações são apenas parcialmente formadas ou quebradas. No entanto, para algumas enzimas, podem ser sintetizados análogos que, embora estáveis, ainda mostram algumas das características estruturais do estado de transição.

A penicilina (Fig. 6.9) é um bom exemplo de análogo do estado de transição. Ela inibe a transpeptidase que catalisa as ligações cruzadas entre os filamentos de peptidioglicanas da parede da célula bacteriana, a última etapa da síntese da parede das bactérias. A penicilina tem um anel lactama estendido de quatro membros que

mimetiza o estado de transição do substrato normal. Quando a penicilina se liga ao local ativo da enzima, seu anel lactama abre, formando uma ligação covalente com um resíduo de serina no local ativo. A penicilina é um potente inibidor irreversível da síntese da parede bacteriana, tornando a bactéria osmoticamente frágil e incapaz de sobreviver no organismo.

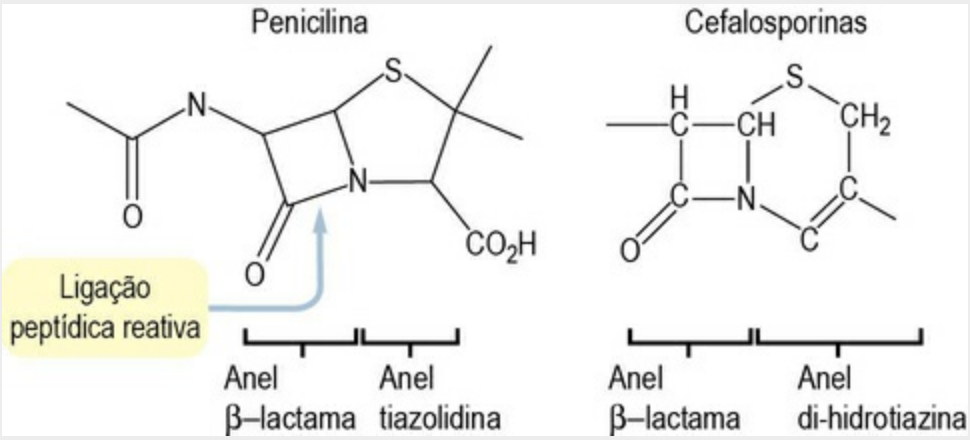


FIG. 6.9 Estrutura da penicilina mostrando a ligação peptídica reativa no anel β-lactama e o centro estrutural das cefalosporinas.
As penicilinas contêm o anel β-lactama conjugado ao anel tiazolidina. As cefalosporinas são outra classe de compostos contendo o anel β-lactama fundido ao anel di-hidrotiazina de seis membros. Devido à sua eficiência e falta de toxicidade, os compostos β-lactama são antibióticos amplamente usados. Bactérias com β-lactamase, que quebra o anel β-lactama, são resistentes a esses antibióticos.

Regulação da atividade enzimática

Em vias metabólicas de múltiplas etapas, a etapa mais lenta limita a velocidade da reação

É mais eficiente regular uma via metabólica pelo controle de enzimas-chave que estão envolvidas nessa etapa limitante da velocidade. Em geral, cinco mecanismos independentes estão envolvidos na regulação da atividade enzimática.

- A expressão da proteína enzima por seus correspondentes genes muda em resposta a mudanças do ambiente das células ou devido a demandas metabólicas.
- Enzimas podem ser irreversivelmente ativadas ou inativadas por enzimas proteolíticas.
- Enzimas podem ser irreversivelmente ativadas ou inativadas por modificação covalente, como fosforilação.
- A regulação alostérica modula a atividade de enzimas-chave por ligação de pequenas moléculas em locais diferentes do local ativo em um processo que é relativamente rápido e, daí, a primeira resposta das células à mudança de condições.
- A degradação de enzimas por proteases intracelulares dos lisossomos ou pelos proteossomos no citosol também determina o tempo de permanência das enzimas e, consequentemente, a atividade enzimática ao longo de um período de tempo maior.

Apesar de estudos extensos, ainda não é possível deduzir com precisão a atividade de enzimas específicas no corpo; muitos fatores, incluindo concentrações de substratos, pH e efetores alostéricos, alteram-se ao longo do tempo em condições fisiológicas. Os avanços tecnológicos possibilitam agora a medição de milhares de metabólitos quantitativa e simultaneamente nos tecidos – um campo em evolução conhecido como metabolômica (Cap. 36). Usando as ferramentas da enzimologia básica e da metabolômica, será eventualmente possível medir o fluxo endógeno por meio de vias metabólicas complexas *in vivo*.

Ativação proteolítica de enzimas da digestão

Algumas enzimas são armazenadas em organelas ou compartimentos subcelulares em uma forma precursora inativa

Muitas enzimas digestivas são estocadas no pâncreas como zimogênios inativos ou proenzimas em vesículas secretoras. Os zimogênios são secretados no suco pancreático em seguida a uma refeição e ativados no trato gastrintestinal. Tripsinogênio é convertido em tripsina pela ação da enteropeptidase intestinal. Essa enzima fica na superfície interna do duodeno e hidrolisa o peptídio *N*-terminal do tripsinogênio inativo. O rearranjo da estrutura terciária do produto resulta na forma proteoliticamente ativa da tripsina. A tripsina ativa digere outros zimogênios, tais como pró-carboxipeptidase, pró-elastase e quimotripsinogênio, bem como outras moléculas de tripsinogênio (Cap. 10). Cascatas proteolíticas similares são observadas na coagulação do sangue e na fibrinólise (dissolução dos coágulos) (Cap. 7).

Regulação alostérica das enzimas que limitam a velocidade de vias metabólicas

As enzimas alostéricas possuem curvas de velocidade de reação versus concentração de substrato sigmoide e não hiperbólica

A curva de saturação do substrato para uma enzima "isostérica" (de um único formato) é hiperbólica (Fig. 6.5A). Diferentemente, as curvas de velocidade de reação *versus* concentração de substrato [S] das enzimas alostéricas mostram gráficos sigmoides (Fig. 6.10). Uma molécula de efetor alostérico (outro local) liga-se na enzima em um local que é distinto e fisicamente separado do local de ligação do substrato, afetando a ligação do substrato (K_m) e/ou k_{cat}. Em alguns casos, o substrato pode exercer efeitos alostéricos, o que é considerado um efeito **homotrópico**. Se um efetor alostérico é diferente do substrato, o efeito é chamado **heterotrópico**. Efeitos homotrópicos são observados quando a reação de uma molécula de substrato com uma enzima multimérica afeta a ligação de uma segunda molécula do substrato em um diferente local ativo da enzima. A interação entre as subunidades faz a ligação do substrato ficar cooperativa e resulta em uma curva sigmoide no gráfico v *versus* [S]. Esse efeito é, em sua essência, idêntico àquele

descrito para ligação do O_2 na hemoglobina (Cap. 5), exceto que, no caso das enzimas, a ligação do substrato leva a uma reação catalisada por enzima.

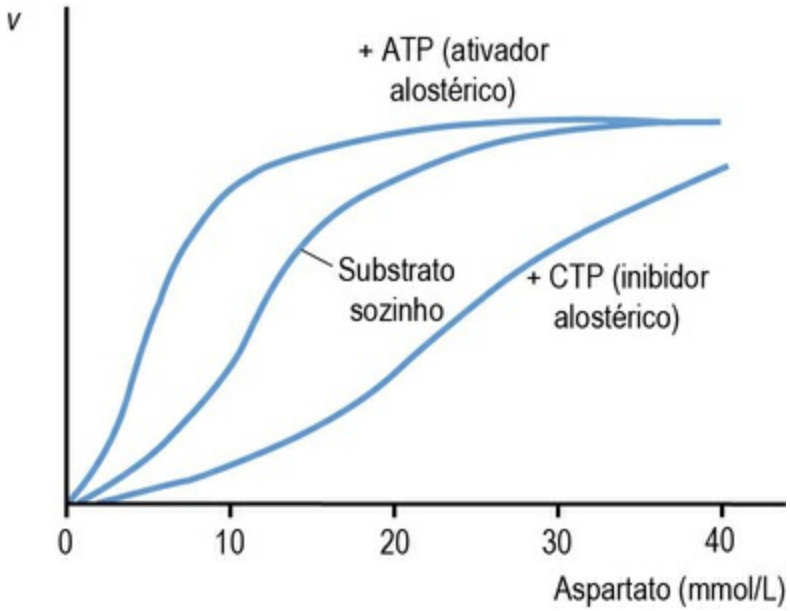


FIG. 6.10 Regulação alostérica da aspartato transcarbamoilase (ATCase). Gráfico de velocidade (v) *versus* concentração de substrato na presença de um ativador ou inibidor alostérico. ATCase é um exemplo de enzima alostérica. O aspartato (substrato) regula homotropicamente a atividade da ATCase, segundo uma cinética sigmoide. CTP, um produto final, inibe heterotropicamente; no entanto, ATP, um precursor, ativa heterotropicamente a ATCase.

Quadro clínico

A hemofilia é causada por um defeito na ativação de um zimogênio

Uma criança foi internada em um hospital com sangramento muscular que afetava o nervo femoral. Achados laboratoriais indicaram distúrbio da coagulação do sangue, hemofilia A, que resulta da deficiência do fator VIII. Administrou-se o fator VIII ao paciente para restaurar a atividade de coagulação do sangue.

Comentário

A formação de um coágulo sanguíneo resulta de uma cascata de reações de ativação de zimogênios. Mais de uma dúzia de proteínas diferentes conhecidas como fatores de coagulação sanguínea está envolvida. Na etapa final, o coágulo é formado pela conversão de uma proteína solúvel, o fibrinogênio (fator I), em um produto insolúvel fibroso, a fibrina, que forma a matriz do coágulo. Esta última etapa é catalisada por uma serina protease, a trombina (fator IIa). A hemofilia é um distúrbio da coagulação do sangue causada por um defeito em um dos fatores da sequência das reações. A hemofilia A, uma forma principal (85%) de hemofilia, é causada por um defeito no fator de coagulação VIII (Cap. 7).

Quadro de conceitos avançados

Análogos de nucleosídios são usados como agentes antivirais

Análogos de nucleosídios, tais como aciclovir e ganciclovir, vêm sendo usados para o tratamento do herpes-vírus simples (HSV), da varicela-zóster (VZV) e do citomegalovírus (CMV). Essas substâncias são pró-fármacos ativados por fosforilação e paralisam a síntese do DNA viral pela inibição da sua DNA polimerase. A timidina cinase (TK) dos vírus, mais propriamente uma cinase de nucleosídios, fosforila nucleosídios para formar seus monofosfatos. Cinases celulares, a seguir, adicionam um fosfato para formar compostos trifosfatos ativos, que são inibidores competitivos da DNA polimerase viral durante a replicação do DNA (Cap. 32).

Enquanto a TK viral tem baixa especificidade para o substrato e fosforila eficientemente análogos de nucleosídios, as nucleosídios cinases das células apresentam alta especificidade pelos seus substratos e quase não fosforilam os análogos de nucleosídios. Assim, as células infectadas pelos vírus estão inclinadas a sofrer arresto em um estágio específico do ciclo celular, o ponto de controle G_2-M (Cap. 42), mas as células não infectadas são resistentes aos análogos dos nucleosídios.

Cooperatividade positiva e negativa

A **cooperatividade positiva** indica que a reação de um substrato com um local ativo deixa mais fácil a reação de outro substrato em outro local ativo. A **cooperatividade negativa** significa que a reação de um substrato com um local ativo torna mais difícil para um substrato reagir em outro local ativo. Desde que a afinidade da enzima mude com a concentração do substrato, ela não pode ser descrita pela cinética simples de Michaelis-Menten. Ao contrário, a cooperatividade é caracterizada pela concentração de substrato que possibilita a metade da velocidade máxima, $[S]_{0,5}$, e o **coeficiente de Hill** (H) (Cap. 5). Os valores de H são maiores que 1 para as enzimas que apresentam cooperatividade positiva e, para aquelas com cooperatividade negativa, são menores que 1. As concentrações intracelulares dos substratos da maioria das enzimas alostéricas são mantidas ao redor do valor $[S]_{0,5}$, tal que a atividade da enzima responde a pequenas mudanças da concentração do seu substrato.

Quadro clínico

Envenenamento por inseticida

Um homem de 55 anos estava borrifando um inseticida composto por fluorofosfatos orgânicos em um campo de arroz. Subitamente, ele sentiu dor de cabeça frontal, dor nos olhos e aperto no peito, sinais típicos da superexposição a fluorofosfatos orgânicos tóxicos. Levado a um hospital e tratado com injeção intravenosa de 2 mg de sulfato de atropina, recuperou-se pouco a pouco.

Comentário

Fluorofosfatos orgânicos formam complexos covalentes fosforil-enzima com serinaproteases e esterases, tais como acetilcolinesterase. Assim, inibem irreversivelmente essas enzimas. A acetilcolinesterase encerra a ação da acetilcolina durante a atividade neuromuscular (Cap. 41) ao hidrolisá-la em acetato e colina. A inibição dessa enzima prolonga a ação da acetilcolina, levando à constante estimulação neuromuscular. A atropina bloqueia competitivamente a ligação da acetilcolina e a estimulação na junção neuromuscular.

O modelo mais frequentemente referido para compreender o comportamento alostérico foi estabelecido por Monod, Wyman e Changeaux, o chamado **modelo concertado** (Fig. 6.11). Como no caso da ligação do O_2 com a hemoglobina, na ausência de substrato, a enzima tem baixa afinidade pelo substrato e está no estado T (tenso); a outra conformação da enzima é o estado R (relaxado). A ligação de moléculas do efetor alostérico muda uma fração da enzima de um estado para o outro. Nesse modelo, todos os locais ativos em estado R são os mesmos e todos têm maior afinidade pelo substrato que no estado T. Pelo fato de a transição entre os estados T e R ocorrer ao mesmo tempo para todas as subunidades, este é chamado de modelo concertado (de dois estados). Um modelo alternativo, chamado **modelo sequencial (multiestado)**, foi proposto por Koshland, Nèmethy e Filmer. Ele postula que cada subunidade muda independentemente para uma conformação diferente e que as diversas subunidades podem ter diferentes afinidades para o substrato. Atualmente, reconhece-se que ambos os modelos são aplicáveis para diferentes enzimas.

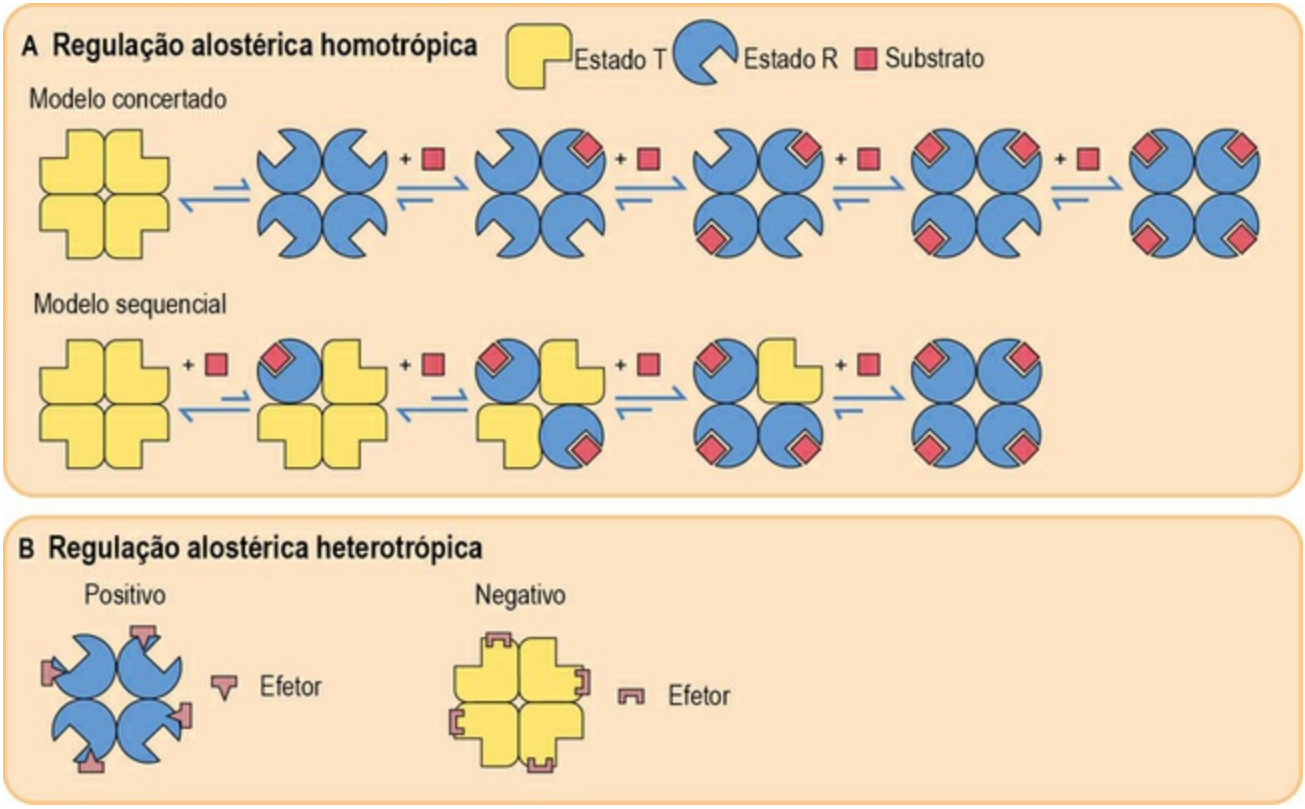


FIG. 6.11 Representação esquemática da regulação alostérica. **(A)** Na regulação homotrópica, o substrato age como um efetor alostérico. Dois modelos são apresentados. No modelo concertado, todas as subunidades convertem-se do estado T (tenso; baixa afinidade pelo substrato) para o estado R (relaxado; alta afinidade pelo substrato) ao mesmo tempo; no modelo sequencial, elas mudam uma por uma, em cada reação de ligação do substrato. **(B)** Na regulação heterotrópica, o efetor é diferente do substrato e liga-se em um local estruturalmente diferente na enzima. Efetores positivos e negativos estabilizam a enzima nos estados R e T, respectivamente.

Medida enzimática da glicose no sangue

O ensaio glicose-oxidase peroxidase

Nos laboratórios clínicos, a maioria dos compostos é dosada por métodos enzimáticos automatizados

O procedimento mais usual é feito com uma mistura de glicose oxidase e peroxidase (Fig. 6.12). A glicose oxidase é altamente específica para a glicose, mas oxida somente o anômero β do açúcar, o que representa aproximadamente 64% da glicose em solução. A mistura do ensaio é, em vista disso, suplementada com mutarotase, que catalisa rapidamente a conversão dos anômeros e aumenta em mais de 50% a sensibilidade do ensaio. A H_2O_2 produzida na reação da oxidase é depois usada por uma reação de peroxidase para oxidar um cromógeno, que será transformado em cromóforo colorido. A cor resultante é diretamente proporcional ao conteúdo de glicose da amostra. Existem versões fluorométricas desse ensaio para alta sensibilidade, e um analisador comercial usa um eletrodo de oxigênio para medir a velocidade de decréscimo na concentração de oxigênio da amostra, que é também diretamente proporcional à concentração de glicose.

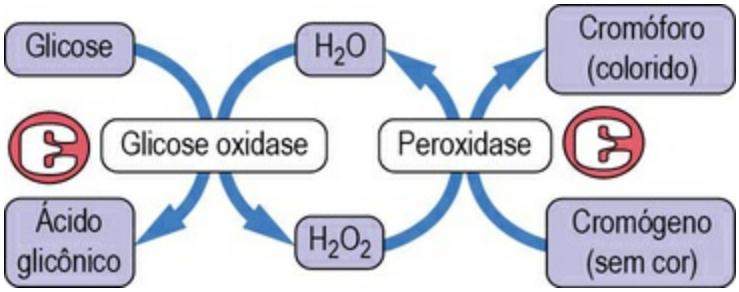


FIG. 6.12 O ensaio glicose oxidase/peroxidase para glicose sanguínea. A cor produzida nesse ensaio é diretamente proporcional à concentração da glicose sanguínea.

Tiras reagentes e glicômetros

Pessoas com diabetes normalmente monitoram os níveis de glicose no sangue, muitas vezes ao longo do dia, usando tiras reagentes e medidores de glicose

As fitas de glicose são impregnadas com um reagente de glicose oxidase-peroxidase (GOP). Na versão não automática desse ensaio, a extensão da alteração da cor em uma tira molhada de sangue está relacionada com a concentração de glicose – geralmente em uma escala de 1 a 4. Glicômetros modernos usam uma pequena gota de sangue (~1 μL) e eletrodos amperométricos para medir a corrente produzida pela reação redox catalisada pela glicose desidrogenase (GDH), que oxida a glicose a ácido glicônico, mas reduz a coenzima em lugar do oxigênio. Em geral, utilizam-se tais ensaios quando são necessárias medidas rápidas e frequentes da glicose sanguínea. Quando ensaios GOP e GDH foram comparados à alta altitude em uma subida ao monte Kilimanjaro, o ensaio GOP, que depende do oxigênio ambiente, mostrou um erro maior. Ambos os processos são menos acurados a baixas temperaturas e alta altitude.

Ensaios cinéticos

Os ensaios cinéticos são mais rápidos que os ensaios de término (endpoint)

No ensaio descrito na Figura 6.12 e colocado em gráfico quando usadas várias concentrações de glicose na Figura 6.13A, deixa-se a reação ocorrer até o seu fim; isto é, até que a quantidade total de glicose tenha sido oxidada, quando então é medida a mudança de cor. Então, a cor produzida é plotada em um gráfico contra um padrão para determinar a concentração da glicose sanguínea (Fig. 6.13B). Analisadores cinéticos de resposta ultrarrápida estimam a concentração de glicose em uma amostra medindo a velocidade inicial da reação. A análise do gráfico cinético na Figura 6.13A, por exemplo, indica que ambas as determinações, de término de progresso da reação *endpoint* ou cinética da glicose oxidase, dependem da concentração de glicose. Assim, para estimar a concentração da glicose em uma amostra (Fig. 6.13C), o analisador pode medir a mudança na absorvância (ou algum outro parâmetro) durante os tempos iniciais da reação e comparar essa velocidade com a de uma solução padrão. Esses ensaios são feitos em analisadores de fluxo ou de centrifugação para garantir mistura rápida dos reagentes

com a amostra. Analisadores cinéticos são inerentemente mais rápidos que os ensaios de término *(endpoint)* porque eles estimam a concentração de glicose antes que do término. Esses ensaios funcionam porque a glicose oxidase e a glicose desidrogenase têm uma K_m alta para a glicose. Nas concentrações de glicose encontradas no sangue, a velocidade da reação da oxidase é proporcional à concentração de glicose; isto é, na região de primeira ordem da equação de Michaelis-Menten em que a concentração de substrato é menor que a K_m (Fig. 6.4).

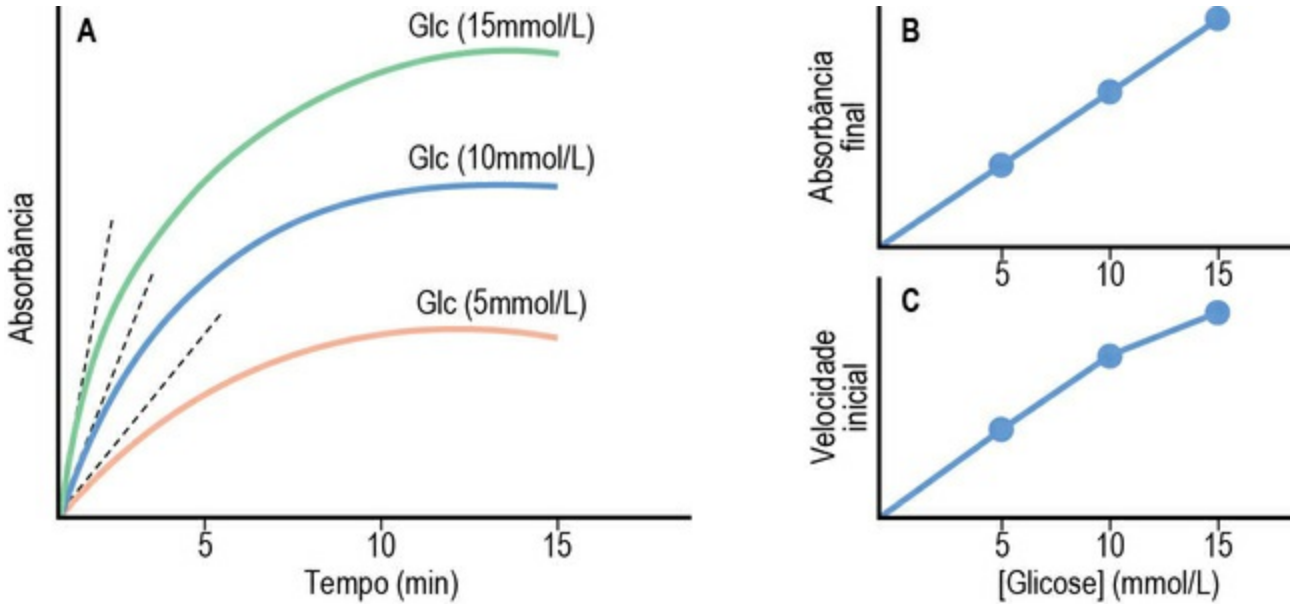


FIG. 6.13 Ensaios glicose oxidase/peroxidase – ensaios de término *endpoint versus* ensaios cinéticos. **(A)** Análise gráfica de um ensaio de término "endpoint". **(B)** As absorbâncias finais (*endpoint*) são plotadas como função da concentração de glicose, fornecendo uma linha reta. **(C)** Velocidades iniciais das reações são estimadas por medidas múltiplas nos instantes iniciais do ensaio (linhas pontilhadas na moldura A) e plotadas *versus* a concentração de glicose. Gráficos não lineares, quando obtidos, são analisados em computador.

Resumo

- A maior parte do metabolismo é catalisada por catalisadores biológicos chamados de enzimas. Suas atividades catalíticas acontecem à temperatura corporal e elas são estritamente controladas por vários mecanismos.
- As modificações covalente e não covalente estão envolvidas nessa regulação e possibilitam controle metabólico eficiente. A atividade enzimática pode ser inibida (ou ativada) por compostos sintéticos (fármacos), compostos exógenos (toxinas) e compostos endógenos (efetores alostéricos).
- A análise cinética da reação enzimática é útil para avaliar o papel biológico das enzimas e para elucidar os seus mecanismos de reação.
- Ensaios de enzimas no sangue são úteis ao diagnóstico e monitoramento de muitas condições clínicas.

Questões para aprendizagem

1. Qual é o ponto mais efetivo para controlar o fluxo de substrato por um caminho metabólico que acontece em uma sequência de reações enzimáticas? Que efeito terá um inibidor de uma enzima limitante de velocidade sobre a concentração dos substratos de uma via multissequencial?
2. A maior parte dos fármacos é estruturada para inibir enzimas específicas dos sistemas biológicos. O Prozac® tem tido profundo efeito no tratamento médico da depressão. Reveja a história de desenvolvimento do Prozac®, ilustrando a importância da especificidade para o mecanismo da ação desse fármaco.
3. Discuta alguns exemplos de inibidores enzimáticos reversíveis e irreversíveis que são usados na prática médica.
4. Camundongos nocauteados são aqueles que perderam um gene específico. Discuta o impacto de camundongos nocauteados para direcionar o desenvolvimento de fármacos na indústria farmacêutica.

Leituras sugeridas

Androutsopoulos, V. P., Hernandez, A. F., Liesivuori, J., et al. A mechanistic overview of health associated effects of low levels of organochlorine and organophosphorous pesticides. *Toxicology*. 2012. [doi: 10.1016/j.tox.2012.09.011].

Christenson, R. H., Duh, S. H. Methodological and analytic considerations for blood biomarkers. *Prog Cardiovasc Dis*. 2012; 55:25–33.

Claudino, W. M., Goncalves, P. H., di Leo, A., et al. Metabolomics in cancer: A bench-to-bedside intersection. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2012.

DeFeo, E. M., Wu, C. L., McDougal, W. S., et al. A decade in prostate cancer: from NMR to metabolomics. *Nat Rev Urol*. 2011; 8(6):301–311.

Lippi, G., Valentino, M., Cervellin, G. Laboratory diagnosis of acute pancreatitis: in search of the Holy Grail. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2012; 49:18–31.

Lopez-Otin, C., Matrisian, L. M. Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nat Rev Cancer*. 2007; 7:800–808.

Niemela, O., Alatalo, P. Biomarkers of alcohol consumption and related liver disease. *Scand J Clin Lab Invest*. 2010; 70:305–312.

Öberg, D., Östenson, C-G. Performance of glucose dehydrogenase-and glucose oxidase-based blood glucose meters at high altitude and low temperature. *Diabetes Care*. 2005; 28:1261.

Spratt, B. G. The 2011 Garrod Lecture: From penicillin-binding proteins to molecular endocrinology. *J Antimicrob Chemother*. 2012; 67:1578–1588.

Teicher, B. A., Linehan, W. M., Helman, L. J. Targeting cancer metabolism. *Clin Cancer Res*. 2012; 18:5537–5545.

Zhang, G. F., Sadhukhan, S., Tochtrop, G. P., et al. Metabolomics, pathway regulation, and pathway discovery. *J Biol Chem*. 2011; 286:23631–23635.

Sites

Clinical Enzymology: www.labtestsonline.org/

International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine: www.ifcc.org/

Chymotrypsin, mechanism of action: www.chembio.uoguelph.ca/educmat/chm258/lecture12.pdf

Serine proteases: www.med.unibs.it/~marchesi/pps97/course/section12/serprot1.html

Enzyme classification: www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/rules.html

The Comprehensive Enzyme Information System: www.brenda-enzymes.info/

A Database of Enzyme Catalytic Mechanisms: http://mbs.cbrc.jp/EzCatDB/

The Enzyme Database: www.enzyme-database.org/

Enzyme nomenclature: www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/
Enzyme nomenclature database: http://enzyme.expasy.org/
Enzyme structures database: www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/enzymes/
IntEnz (Integrated relational Enzyme database): www.ebi.ac.uk/intenz/
A resource portal for enzymes: www.enzymedirectory.com/

CAPÍTULO 7

Hemostasia e Trombose

Gordon D.O. Lowe and Catherine N. Bagot

Objetivos

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever os mecanismos sequenciais envolvidos na hemostasia normal.
- Resumir os processos pelos quais a parede do vaso regula a hemostasia e a trombose.
- Descrever o papel das plaquetas na hemostasia e na trombose.
- Descrever as vias por meio das quais os fármacos antiplaquetários atuam.
- Descrever as vias da coagulação sanguínea e como elas são avaliadas em laboratório clínico para a identificação de distúrbios da coagulação.
- Descrever os inibidores fisiológicos da coagulação sanguínea.
- Descrever as vias por meio das quais os fármacos anticoagulantes atuam.
- Descrever os principais componentes do sistema fibrinolítico.
- Descrever como os fármacos trombolíticos (fibrinolíticos) atuam.

Introdução

É essencial que o sangue não extravase excessivamente dos vasos sanguíneos quando estes são danificados pelos traumas da vida cotidiana

A circulação do sangue dentro do sistema cardiovascular é essencial para o transporte de gases, nutrientes, minerais, produtos metabólicos e hormônios entre os diferentes órgãos. Além disso, é fundamental que o sangue não extravase excessivamente para fora dos vasos sanguíneos quando os mesmos sofrem lesões causadas por traumas da vida diária. A evolução animal resultou, portanto, no desenvolvimento de uma série eficiente, porém complexa, de mecanismos hemodinâmicos, celulares e bioquímicos, que limita a perda sanguínea através da formação de tampões de plaqueta-fibrina nos locais de lesão vascular **(hemostasia)**. Os distúrbios genéticos que resultam na perda da função de

proteínas específicas e, consequentemente, em sangramento excessivo (p. ex., hemofilia) têm se mostrado importantes na identificação de muitos mecanismos bioquímicos da hemostasia.

É essencial também que esses mecanismos hemostáticos sejam controlados adequadamente por mecanismos inibitórios; caso contrário, a formação exagerada de tampão de plaqueta-fibrina pode levar à oclusão local de um vaso sanguíneo importante (artéria ou veia) no seu local de origem **(trombose)** ou o tampão pode se soltar e bloquear um vaso sanguíneo mais adiante *(downstream)* **(embolia)**.

A trombose arterial é a principal causa de ataques cardíacos, acidente vascular cerebral e amputações não traumáticas de membros nos países desenvolvidos (aterotrombose é tratada no Capítulo 18). A trombose venosa e a embolia são também causas importantes de óbito e invalidez. O uso clínico de fármacos antitrombóticos (antiplaquetários, anticoagulantes e agentes trombolíticos) é agora amplamente disseminado em países desenvolvidos e requer a compreensão de como eles interferem nos mecanismos hemostáticos para exercerem seus efeitos antitrombóticos.

Hemostasia

Hemostasia significa "parada de sangramento"

Após a lesão do tecido, que leva à ruptura de vasos menores (incluindo traumas diários, injeções, incisões cirúrgicas e extrações dentárias), normalmente ocorre uma série de interações entre a parede do vaso e o sangue circulante, o que resulta na interrupção da perda sanguínea pelos vasos lesionados dentro de poucos minutos (hemostasia). A hemostasia é o resultado do selamento eficaz dos vasos que sofreram rupturas por um tampão hemostático composto de plaquetas sanguíneas e fibrina. A fibrina é derivada do fibrinogênio circulante, enquanto as plaquetas são pequenos fragmentos celulares que circulam no sangue e desempenham uma função no início da hemostasia.

A hemostasia requer a função coordenada dos vasos sanguíneos, das plaquetas, dos fatores da coagulação e do sistema fibrinolítico

A Figura 7.1 fornece um esquema geral dos mecanismos hemostáticos e ilustra algumas das interações entre os vasos sanguíneos, as plaquetas e o sistema de coagulação na hemostasia; cada um desses componentes da hemostasia também interage com o sistema fibrinolítico. A resposta inicial dos pequenos vasos sanguíneos à lesão é a vasoconstrição arteriolar, o que reduz temporariamente o fluxo sanguíneo local. A redução do fluxo diminui transitoriamente a perda sanguínea e pode também promover a formação do tampão de plaqueta-fibrina. Após a ativação das plaquetas sanguíneas, ocorre a adesão das mesmas à parede do vaso no local da lesão e posterior agregação de umas com as outras, levando à construção de uma massa oclusiva de plaquetas e formação do tampão hemostático inicial (primário). Esse tampão de plaquetas é friável e, a menos que seja posteriormente estabilizado pela fibrina, será levado embora pela pressão sanguínea local quando a vasoconstrição for revertida.

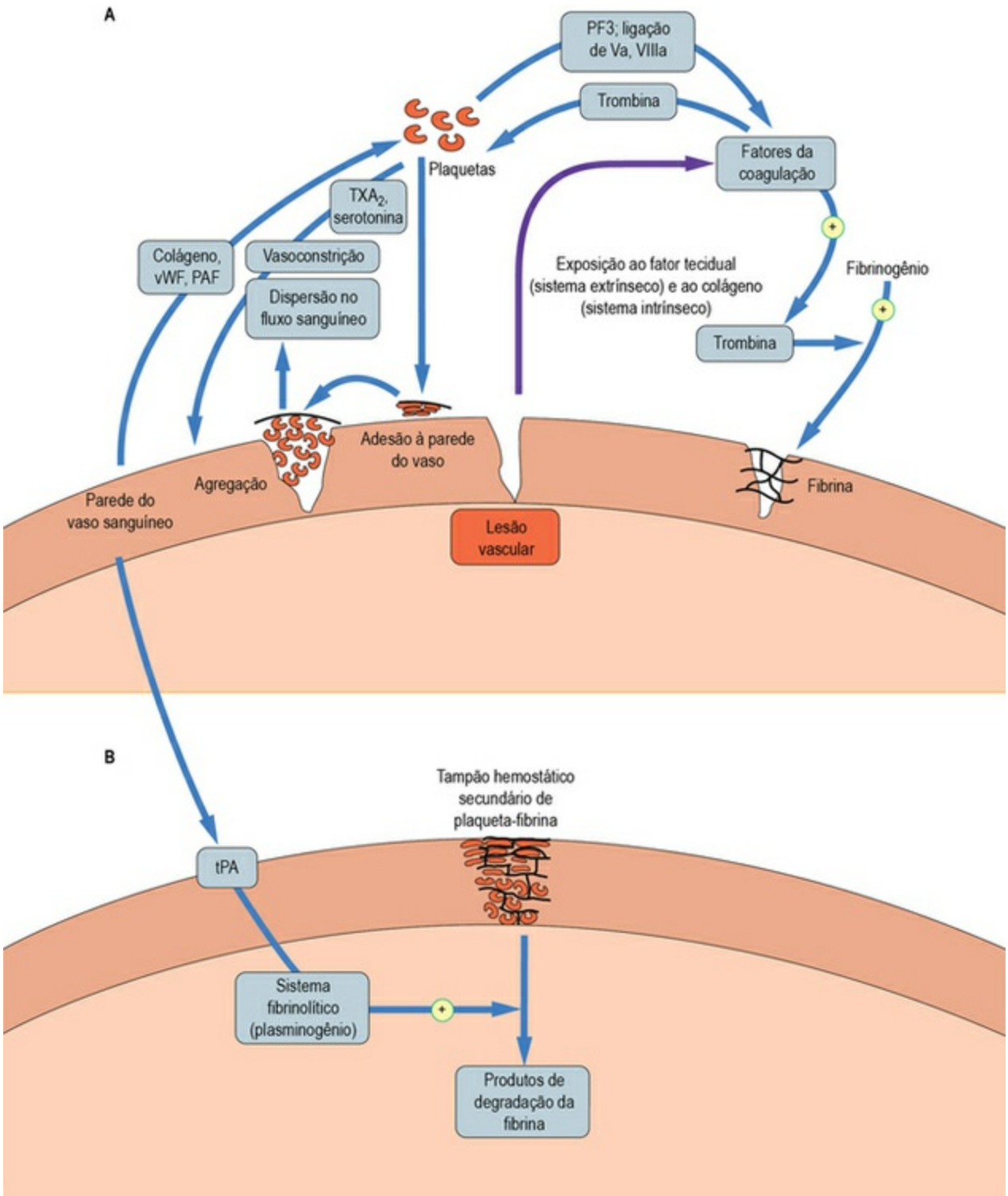


FIG. 7.1 Esquema geral dos mecanismos hemostáticos.
(A) A lesão vascular estabelece uma série de eventos que culminam na formação de um tampão plaquetário primário. Este pode se dispersar pelo fluxo sanguíneo ao longo dos vasos, a menos que o tampão seja estabilizado. **(B)** O tampão primário é estabilizado por uma rede de fibrina (formada a partir do fibrinogênio com ligações cruzadas). O tampão secundário é estável e somente será degradado quando o sistema fibrinolítico for ativado. PAF, fator de ativação de plaquetas; PF3, fator plaquetário 3; tPA, ativador do plasminogênio tecidual; TXA_2, tromboxano A_2; Va, fator V da coagulação ativado; VIIIa, fator VIII da coagulação ativado; vWF, fator de von Willebrand. Reproduzido de Dominiczak MH. Medical Biochemistry Flash Cards. London: Elsevier, 2012.

A lesão vascular também ativa os fatores de coagulação que interagem sequencialmente para gerar a trombina, que é responsável pela conversão do fibrinogênio plasmático, circulante e solúvel, em fibrina, com ligações cruzada e insolúvel. Esta forma o tampão hemostático subsequente (secundário), o qual é

relativamente resistente à dispersão pelo fluxo sanguíneo ou fibrinólise. Existem duas vias de ativação dos fatores de coagulação: a via extrínseca, que é iniciada pela exposição do sangue circulante ao fator tecidual, liberado pelo tecido subendotelial; e a via intrínseca, que desempenha papel importante na amplificação da geração de trombina e fibrina.

A lise da fibrina é tão importante para a saúde quanto a sua formação

A hemostasia é um processo contínuo ao longo da vida, e resultaria em formação excessiva de fibrina e oclusão vascular caso não fosse controlada. A evolução produziu, então, um sistema fibrinolítico; este é ativado pela formação de fibrina local, resultando na geração local de plasmina, uma enzima que digere os tampões de fibrina (paralelamente aos processos de reparo tecidual), mantendo, assim, a desobstrução vascular. A digestão da fibrina resulta na formação de produtos de degradação da fibrina (PDF) circulantes. Esses produtos são detectados no plasma de indivíduos saudáveis em baixas concentrações, o que demonstra que a formação e a lise de fibrina são processos contínuos na saúde.

O sangramento excessivo pode resultar de defeitos em cada um dos componentes da hemostasia, os quais podem ser causados por doença (congênita ou adquirida) ou pelo uso de fármacos antitrombóticos (Tabela 7.1). Os componentes vasculares, plaquetários, de coagulação e fibrinolíticos da hemostasia serão discutidos a seguir.

Tabela 7.1

Causas congênitas e adquiridas de sangramento excessivo

	Congênitas	Adquiridas
Parede do vaso	Distúrbios da síntese de colágeno (síndrome de Ehlers-Danlos)	Deficiência de vitamina C (escorbuto) Excesso de corticosteroides
Plaquetas	Distúrbios de adesão Deficiência de vWF (doença de von Willebrand) Deficiência de GPIb-IX plaquetária (síndrome de Bernard-Soulier) Distúrbios de agregação Deficiência de GPIIb-IIIa plaquetária (trombastenia de Glanzmann) Distúrbios de grânulos de armazenamento (i. e., distúrbios de *pool* de armazenamento afetando os grânulos alfa, os grânulos densos ou ambos) Distúrbios da secreção plaquetária e da transdução de sinal (p. ex., defeitos em interações plaqueta-agonista, anormalidades na via do ácido araquidônico)	Fármacos antiplaquetários (p. ex., Aspirina®, dipiridamol, clopidogrel) Formação defeituosa de plaquetas Destruição excessiva de plaquetas
Coagulação	Deficiências de fatores de coagulação (hemofilias): Fator VIII Fator IX Fator XI Fibrinogênio etc.	Deficiência de vitamina K (fatores II, VII, IX, X) Anticoagulantes parenterais; por exemplo, heparina não fracionada (UFH), heparina de baixo peso molecular (LMWH) Anticoagulantes orais (antagonistas da vitamina K, como varfarina; inibidores diretos da trombina, como dabigatrano; inibidores diretos do fator Xa, como rivaroxaban), doença hepática Coagulação intravascular disseminada (CID)
Fibrinólise	Deficiência de antiplasmina Deficiência de PAI-1	Fármacos fibrinolíticos (p. ex., tPA, urocinase, estreptocinase)

GPIb-IX, GPIIb-IIIa, receptores glicoproteicos Ib-IX e IIb-IIIa; PAI-1, inibidor 1 do ativador de plasminogênio; tPA, ativador tecidual de plasminogênio.

A parede do vaso

A lesão vascular tem um papel-chave no início da formação local do tampão de plaqueta-fibrina e na sua posterior remoção pelo sistema fibrinolítico

Todos os vasos sanguíneos são revestidos por uma camada plana de células endoteliais, as quais têm funções importantes na troca de substâncias químicas, células e microrganismos entre o sangue e os tecidos corporais. As células endoteliais nos vasos sanguíneos pequenos (capilares) são sustentadas por uma fina camada de tecido conjuntivo, rico em fibras de colágeno, denominada íntima. Nas veias, uma camada estreita (a média) de células de músculo liso contrátil possibilita alguma vasoconstrição: por exemplo, as veias superficiais sob a pele se contraem em resposta ao resfriamento da superfície. Nas artérias e arteríolas, uma camada muscular bem desenvolvida torna possível potente vasoconstrição, incluindo a vasoconstrição após o dano local, que

constitui parte da resposta hemostática. Os vasos de maior calibre também contêm o tecido conjuntivo de sustentação na camada mais externa (a adventícia).

Quadro de conceitos avançados

Prostaciclina e óxido nítrico: mediadores bioquímicos da vasoconstrição e vasodilatação

O diâmetro das artérias e arteríolas é constantemente alterado para regular o fluxo sanguíneo de acordo com as necessidades cardiovasculares. Os mecanismos de controle incluem as vias neurogênica (simpática/adrenérgica; Cap. 41.1) e miogênica; e os mediadores bioquímicos locais incluem prostaciclina (PGI_2) e óxido nítrico.

A **prostaciclina** é o principal metabólito do ácido araquidônico formado pelas células vasculares. Ela é um potente vasodilatador e também um potente inibidor da agregação plaquetária. Tem uma meia-vida curta no plasma (3 minutos).

O **óxido nítrico** é também um potente vasodilatador formado pelas células endoteliais vasculares, também com meia-vida curta. Foi inicialmente chamado de fator relaxante derivado do endotélio (EDRF). Assim como a prostaciclina, sua geração pelas células endoteliais é aumentada por muitos compostos, e também pelo fluxo sanguíneo e força de cisalhamento (a força tangencial aplicada nas células pelo fluxo de sangue). Na circulação normal, o óxido nítrico parece ter um papel importante na vasodilatação mediada pelo fluxo sanguíneo. Ele é sintetizado por duas formas distintas de óxido nítrico sintase endoteliais (eNOS): constitutiva e induzida. A eNOS constitutiva rapidamente fornece quantidades relativamente pequenas de óxido nítrico por períodos curtos, relacionadas com a regulação do fluxo vascular. Os efeitos benéficos dos fármacos nitrato na hipertensão e na angina podem, em parte, refletir seus efeitos sobre essa via (Cap. 18). A eNOS induzida é estimulada por citocinas nas reações inflamatórias e libera grande quantidade de óxido nítrico por longos períodos. Sua supressão por glicocorticoides pode parcialmente explicar seu efeito anti-inflamatório.

Tanto a prostaciclina quanto o óxido nítrico parecem exercer suas ações vasodilatadoras ao se difundirem localmente das células endoteliais para as células de músculo liso vasculares, onde elas estimulam a guanilato ciclase, resultando em aumento da formação de 3′,5′-monofosfato de guanosina cíclica (cGMP) e no relaxamento do músculo liso vascular através da alteração da concentração de cálcio intracelular (Cap. 40).

O endotélio normal apresenta uma superfície antitrombótica

O endotélio normal intacto não inicia ou mantém a adesão plaquetária ou a coagulação sanguínea. Sua superfície é antitrombótica. Essa resistência à formação de trombos é, em parte, decorrente da produção pelo endotélio de dois potentes vasodilatadores e inibidores da função plaquetária: a prostaciclina (prostaglandina I_2, PGI_2) e o óxido

nítrico, também conhecido como fator relaxante derivado do endotélio (EDRF).

O dano endotelial expõe o sangue ao fator tecidual e ao colágeno

A vasoconstrição que ocorre após a lesão vascular é parcialmente mediada por dois produtos da ativação plaquetária: a serotonina (5-hidroxitriptamina) e o tromboxano A_2 (TXA_2), um produto do metabolismo de prostaglandinas da plaqueta. O dano à célula endotelial também expõe o fluxo sanguíneo ao fator tecidual subendotelial, que ativa a via extrínseca da coagulação sanguínea (Fig. 7.1). Além disso, após a lesão vascular que desfaz o revestimento de célula endotelial, o fluxo sanguíneo é exposto ao colágeno subendotelial, que ativa a via intrínseca da coagulação sanguínea.



Quadro de conceitos avançados

Tromboxano a_2 e aspirina®

Já foi observado que a PGI_2, o principal metabólito do ácido araquidônico formado pelas células vasculares, é um potente vasodilatador e inibidor da agregação plaquetária. Ao contrário, o principal metabólito do ácido araquidônico formado pelas plaquetas é o **tromboxano A_2 (TXA_2)**, que é um potente vasoconstritor e estimula a agregação plaquetária. Assim como a prostaciclina, o TXA_2 tem uma meia-vida curta. No final da década de 1970, Salvador Moncada e John Vane contrastaram os efeitos de PGI_2 e TXA_2 nos vasos sanguíneos e nas plaquetas, e construíram a hipótese de que um equilíbrio entre esses dois compostos era importante na regulação da hemostasia e da trombose.

As deficiências congênitas de ciclo-oxigenase ou tromboxano sintase (as enzimas envolvidas na síntese de TXA_2) resultam em uma leve tendência ao sangramento. A ingestão, mesmo em doses baixas, de **ácido acetilsalicílico (Aspirina®)** acetila irreversivelmente a ciclo-oxigenase e suprime a síntese de TXA_2 e a agregação plaquetária por vários dias, resultando em um efeito antitrombótico e uma leve tendência ao sangramento. É provável que o sangramento ocorra especialmente no estômago, como resultado da formação de úlceras gástricas, secundárias à inibição das prostaglandinas citoprotetoras da mucosa gástrica pela Aspirina®. Embora em pessoas que apresentem alto risco de trombose arterial (p. ex., infarto agudo do miocárdio prévio) essa tendência ao sangramento seja mais importante que uma redução do risco de trombose, a Aspirina® é contraindicada para indivíduos com história de distúrbios de sangramento e úlceras estomacais ou duodenais já existentes.

A exposição do sangue em circulação ao colágeno, como resultado do dano endotelial, também estimula a ativação plaquetária

As plaquetas se ligam ao colágeno por meio do fator de von Willebrand (vWF), que é liberado das células endoteliais. O vWF, por sua vez, se liga tanto às fibras de colágeno

quanto às plaquetas (via um receptor glicoproteico da membrana de plaquetas, GPIb-IX). O fator de ativação de plaquetas (PAF) da parede do vaso pode também ativar as plaquetas na hemostasia (Fig. 7.1 e Quadro da p. 27).

O colágeno tem um papel-chave na estrutura e na função hemostática de pequenos vasos sanguíneos

Como o colágeno desempenha um papel-chave na estrutura e na função hemostática de pequenos vasos sanguíneos, as causas vasculares de sangramento excessivo incluem as deficiências congênitas ou adquiridas da síntese de colágeno (Tabela 7.1). Os distúrbios congênitos incluem a rara **síndrome de Ehlers-Danlos**. Os distúrbios adquiridos incluem a deficiência de vitamina C relativamente comum, o escorbuto (Cap. 11) e o excesso de corticosteroides exógenos ou endógenos.



Quadro De Conceitos Avançados

A ativação plaquetária expõe receptores glicoproteicos

As plaquetas podem ser ativadas por vários agentes químicos, incluindo difosfato de adenosina (ADP, liberado pelas plaquetas, eritrócitos e células endoteliais), epinefrina, colágeno, trombina e PAF; por infecções (p. ex., HIV, *Helicobacter pylori)*; e pelo alto estresse físico do cisalhamento. Muitos dos agentes químicos parecem agir por meio da ligação a receptores específicos da membrana superficial das plaquetas. Após o estímulo do receptor, várias vias de ativação plaquetária podem ser iniciadas, resultando em vários fenômenos:

- **Mudança no formato das plaquetas**, de um disco para uma esfera, com pseudópodos estendidos, o que facilita a agregação e a atividade coagulante.
- **Liberação de vários compostos envolvidos na hemostasia** provenientes dos grânulos intracelulares; por exemplo: ADP, serotonina, fibronectina e vWF.
- **Agregação**, via exposição do receptor de membrana GPIb-IX e ligação pelo vWF (sob altas condições de força de cisalhamento), e via exposição de outro receptor glicoproteico de membrana, GPIIb-IIIa, e ligação pelo fibrinogênio (sob baixas condições de força de cisalhamento).
- **Adesão à parede do vaso** por meio da exposição do receptor de membrana GPIb-IX, através do qual o vWF liga as plaquetas ao colágeno subendotelial.

Finalmente, o estímulo do receptor de membrana das plaquetas desencadeia a ativação das fosfolipases da membrana que hidrolisam os fosfolipídios de membrana, liberando ácido araquidônico. O ácido araquidônico é metabolizado por ciclo-oxigenase e tromboxano sintase a TXA_2, um potente, porém instável (meia-vida de 30 segundos), mediador da ativação plaquetária e vasoconstrição.

Plaquetas e distúrbios de sangramento relacionados com as plaquetas

As plaquetas sanguíneas formam o tampão hemostático inicial nos pequenos vasos e o trombo inicial em artérias e veias

As plaquetas são microcélulas anucleadas, circulantes e com diâmetro médio de 2-3 μm. Elas são fragmentos de megacariócitos da medula óssea e circulam por aproximadamente 10 dias no sangue. A concentração normal de plaquetas no sangue é de 150-400 × 10^9/L.

Defeitos congênitos na adesão/agregação plaquetária podem causar o sangramento excessivo por toda a vida

Um simples teste de triagem – medição do tempo de sangramento da pele (faixa normal, 2-9 minutos) – pode frequentemente detectar defeitos congênitos na adesão/agregação plaquetária, nos quais o tempo é caracteristicamente prolongado. O mais comum desses defeitos é a doença de von Willebrand (Tabela 7.1), um grupo de distúrbios tanto autossômicos dominantes como autossômicos recessivos que provocam defeitos quer quantitativos quer qualitativos dos multímeros de vWF. Esses multímeros são compostos por subunidades (peso molecular 220-240 kDa) que são liberadas de grânulos de armazenamento conhecidos como corpos de Weibel-Palade nas células endoteliais e grânulos alfa nas plaquetas. O vWF não desempenha apenas um papel importante na função hemostática das plaquetas, como também transporta o fator VIII da coagulação (fator anti-hemofílico) na circulação e o leva aos locais de lesão vascular. Portanto, as concentrações plasmáticas do fator VIII podem também estar baixas na **doença de von Willebrand.** O tratamento dessa doença consiste em aumentar a baixa atividade plasmática de vWF, geralmente por meio da desmopressina (um análogo sintético da vasopressina (Cap. 24) que libera vWF das células endoteliais no plasma) ou administrando concentrados de vWF derivados do plasma humano.

Os distúrbios de sangramento congênitos relacionados com plaquetas menos comuns incluem a **deficiência de GPIb-IX** (síndrome de Bernard-Soulier), **deficiência de GPIIb-IIIa** (trombastenia de Glanzmann) e **deficiência de fibrinogênio** (porque o fibrinogênio faz pontes entre os receptores GPIIb-IIIa de plaquetas adjacentes).

Os distúrbios adquiridos podem ser causados por formação defeituosa e destruição excessiva ou consumo de plaquetas

Os distúrbios plaquetários adquiridos incluem uma baixa contagem de plaquetas (**trombocitopenia**), que pode resultar da formação defeituosa de plaquetas pelos megacariócitos da medula óssea (p. ex., na mielodisplasia ou leucemia mieloide aguda), da excessiva destruição das plaquetas (p. ex., por anticorpos antiplaquetários) e do consumo excessivo de plaquetas (p. ex., na coagulação intravascular disseminada ou por sequestro em um baço aumentado).

Os fármacos antiplaquetários são usados na prevenção ou tratamento da trombose

arterial

Os fármacos antiplaquetários são utilizados na prevenção ou no tratamento de trombose arterial: seus locais de ação estão ilustrados na Figura 7.2. A Aspirina® inibe a ciclo-oxigenase e, portanto, reduz a formação de TXA_2. Pelo fato de ela também apresentar efeito na redução da formação de PGI_2, que por si só apresenta atividade antiplaquetária, agentes que atuam mais especificamente como inibidores da tromboxano sintase (p. ex., picotamide) ou como antagonistas do receptor do tromboxano, tais como ifetroban, também têm sido investigados como potenciais agentes antiplaquetários, mas não parecem ser mais eficazes que a Aspirina®. O dipiridamol atua reduzindo a disponibilidade de ADP e inibindo a síntese do tromboxano, a ticlopidina e o clopidogrel inibem o receptor de ADP (Fig. 7.2). Esses fármacos têm efeitos antitrombóticos similares aos da Aspirina®; no entanto, causam menos sangramento gástrico porque não interferem na síntese de prostaglandinas no estômago. Os antagonistas de GPIIb-IIIa (p. ex., tirofiban ou abciximabe) também podem ser utilizados na trombose coronária aguda. Cada um desses fármacos antiplaquetários acrescenta eficácia antitrombótica da Aspirina®; contudo, quando utilizados de forma combinada, também aumentam o risco de sangramento.

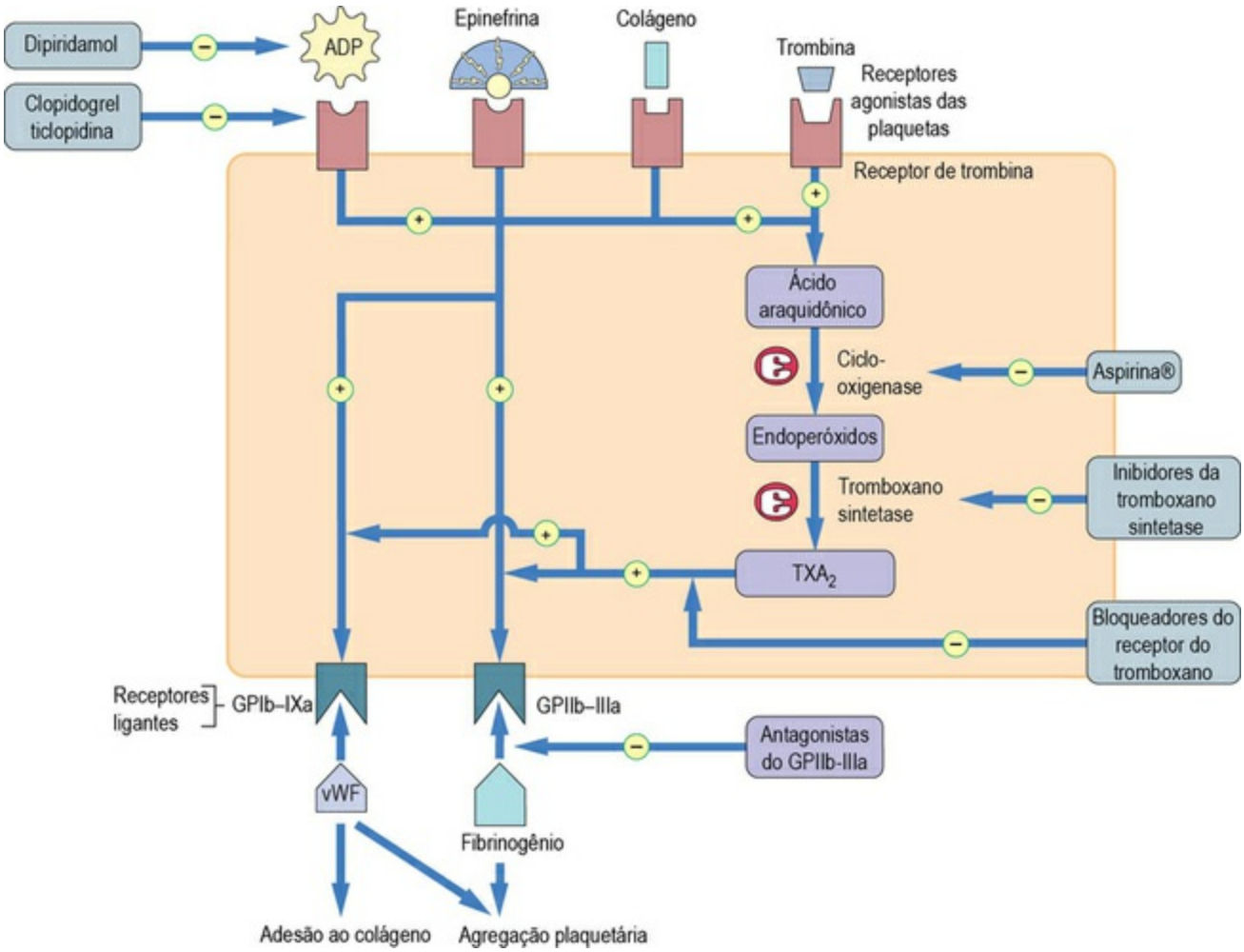


FIG. 7.2 Vias de ativação plaquetária e mecanismos de ação dos fármacos antiplaquetários. O estímulo dos receptores agonistas das plaquetas resulta na exposição dos receptores ligantes das plaquetas parcialmente através da via plaqueta-prostaglandina (ciclo-oxigenase). Os receptores ligantes se ligam ao vWF e ao fibrinogênio na adesão/agregação plaquetária. vWF, fator de von Willebrand; TXA_2, tromboxano A_2.

Quadro De Conceitos Avançados

Receptores de membrana de plaquetas e seus ligantes, vwf e fibrinogênio

As plaquetas desempenham um papel-chave na hemostasia e trombose, através da adesão à parede do vaso e subsequente agregação para formar o tampão hemostático rico em plaquetas ou trombo. Esses processos envolvem exposição de receptores glicoproteicos de membrana específicos após a ativação plaquetária por diversos compostos.

O **receptor da plaqueta GPIb-IX** desempenha papel importante na adesão das plaquetas ao subendotélio. Ele liga o vWF, que também interage com receptores subendoteliais específicos, incluindo aqueles do colágeno subendotelial. As deficiências congênitas de GPIb-IX (síndrome de Bernard-Soulier) ou, mais comumente, de vWF resultam em tendência ao sangramento.

Outro receptor, o **GPIIb-IIIa,** tem papel-chave na agregação plaquetária. Após a ativação das plaquetas, centenas de milhares de receptores GPIIb-IIIa podem ser expostos em uma única plaqueta. Esses receptores interagem com o fibrinogênio ou

com o vWF, que ligam as plaquetas umas às outras, formando um tampão trombótico ou hemostático. Uma deficiência congênita no GPIIb-IIIa (a rara trombastenia de Glanzmann) provoca um distúrbio de sangramento grave; ao contrário, deficiências tanto no fibrinogênio como no vWF causam um distúrbio de sangramento menos grave, porque esses dois ligantes podem ser substituídos um pelo outro. Os inibidores GPIIb-IIIa (p. ex., tirofiban, abciximabe) foram desenvolvidos para pacientes sujeitos à angioplastia por doença arterial coronária, a fim de evitar eventos coronários adicionais.

Coagulação

Os fatores de coagulação sanguínea interagem para formar o tampão hemostático secundário, rico em fibrina, nos pequenos vasos; e o trombo de fibrina secundário, nas artérias e veias

Os fatores de coagulação plasmáticos são identificados por algarismos romanos: eles estão listados na Tabela 7.2, juntamente com algumas de suas propriedades. O fator tecidual era anteriormente conhecido como fator III, o íon cálcio como fator IV; o fator VI não existe.

Tabela 7.2

Fatores de coagulação e algumas de suas propriedades

Fator	Sinônimo	Peso Molecular (Da)	Concentração plasmática (mg/dL)
I	Fibrinogênio	340.000	200-400
II	Protrombina	70.000	10
III	Fator tecidual (tromboplastina)	44.000	0
IV	Íon cálcio*	40	9-10
V	Pró-acelerina, fator lábil	330.000	1
VII	Acelerador de conversãode protrombina sérica (SPCA), fator estável	48.000	0,05
VIII	Fator anti-hemofílico (AHF)	220.000	0,01
(vWF)		(250.000)n	1
IX	Fator de Christmas	55.000	0,3
X	Fator de Stuart- Prower	59.000	1
XI	Antecedente de tromboplastina plasmática (PTA)	160.000	0,5
XII	Fator de Hageman	80.000	3
XIII	Fator estabilizante de fibrina (FSF)	32.000	1-2
Pré-calicreína	Fator de Fletcher	85.000	5
Cininogênio de alto peso molecular (HMMK)	Fator de Fitzgerald, Flaujeac ou Williams, cofator de ativação por contato	120.000	6

n indica o número de subunidades.

*Para converter íon cálcio para mmol/L, divida por 4.

A cascata da coagulação

A Figura 7.3 ilustra o esquema da coagulação sanguínea atualmente aceito. Desde o início da década de 1960 ele tem sido aceito como uma sequência em "cachoeira" ou "cascata" de conversões interativas de pró-enzimas a enzimas, cada uma das enzimas ativando a próxima pró-enzima em sequência(s). Os fatores enzimáticos ativados são designados pela letra "a" (p. ex., fator Xia). Embora o processo da coagulação sanguínea seja complexo e não linear, tradicionalmente, o esquema foi dividido em três partes:

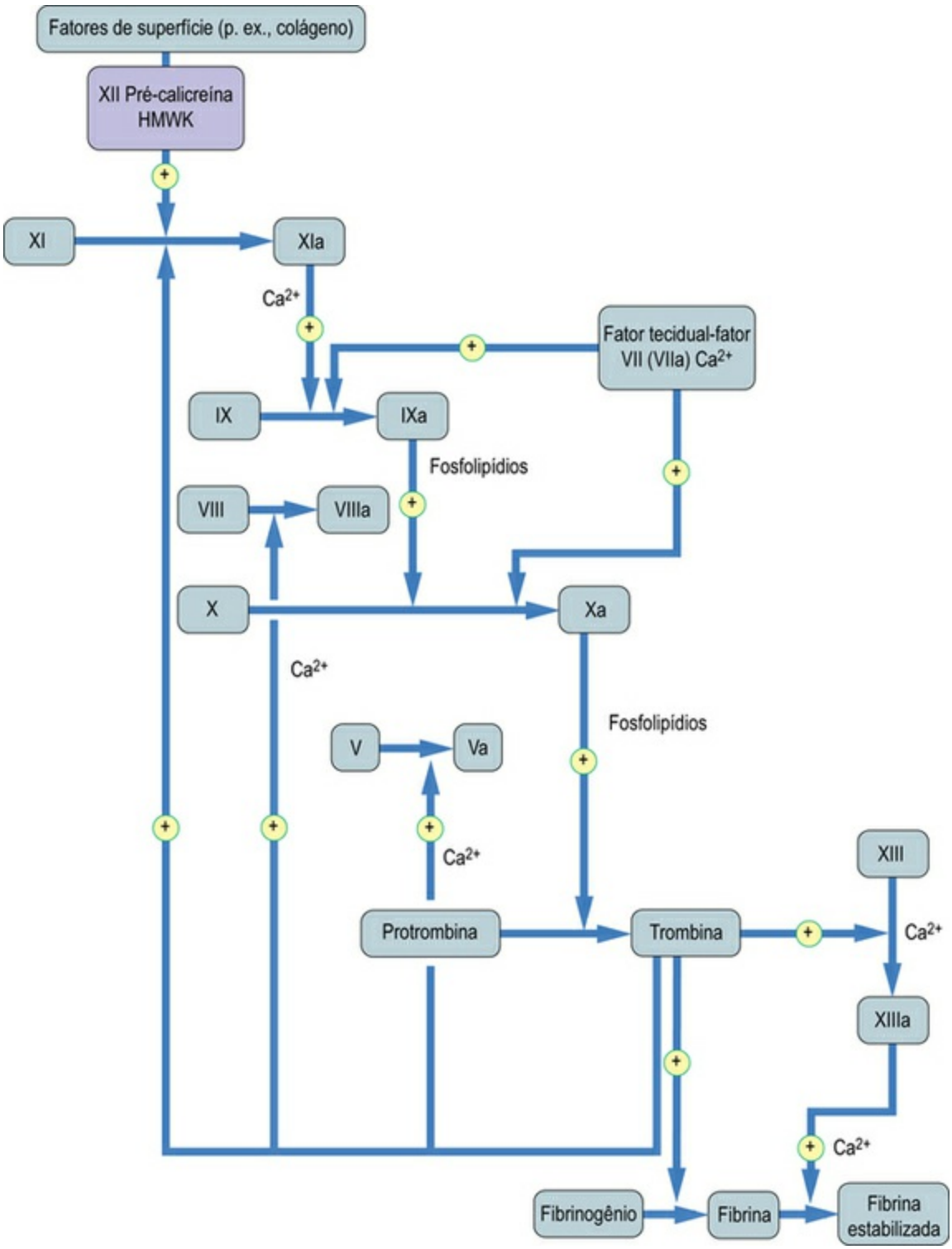


FIG. 7.3 Coagulação sanguínea: ativação dos fatores de coagulação. Após o início da coagulação sanguínea, as pró-enzimas dos fatores de coagulação são ativadas sequencialmente: os fatores enzimáticos ativados são designados pela letra "a". A caixa roxa indica os fatores de contato, que aparentemente não têm função na hemostasia *in vivo*. Os fosfolipídios são supridos *in vivo* pelas plaquetas. Via intrínseca: setas azuis. Via extrínseca: setas vermelhas. Via comum: setas verdes. HMWK, cininogênio de alto peso molecular. Reproduzido de Dominiczak MH. Medical Biochemistry Flash Cards. London: Elsevier, 2012.

- Via intrínseca
- Via extrínseca
- Via final comum.

Avalia-se o estado das vias intrínseca, extrínseca e final comum por meio de testes laboratoriais específicos

Os três componentes do sistema de coagulação se distinguem com base na natureza do fator de iniciação e de seu teste correspondente no laboratório de hemostasia clínica; portanto, são realizados três testes de coagulação nos laboratórios clínicos, em plasma citratado, pobre em plaquetas:

- Tempo de tromboplastina parcialmente ativada (APTT), testando a via intrínseca
- Tempo de protrombina (PT) – a via extrínseca
- Tempo de coagulação da trombina (TCT), testando a via final comum.

O plasma pobre em plaquetas é usado nesses testes porque a contagem de plaquetas influencia os resultados de tempo de coagulação. Para obter plasma pobre em plaquetas, o sangue é coletado em tubos contendo o anticoagulante citrato para sequestrar reversivelmente os íons cálcio, e o sangue é centrifugado a 2.000 *g* por 15 minutos. Os testes de tempo de coagulação se iniciam pela adição de cálcio e agentes iniciadores adequados.

No entanto, esses testes têm suas limitações na descrição do fenótipo de sangue *in vivo* de um paciente para coagular eficazmente. Por conseguinte, os chamados testes globais de coagulação foram desenvolvidos e considera-se que eles reflitam melhor a capacidade de coagulação de um indivíduo. Estes incluem a tromboelastografia e a geração de trombina.

As deficiências congênitas de fatores de coagulação (I-XIII) causam sangramento excessivo

As deficiências congênitas de outros fatores da coagulação (I-XIII) resultam em sangramento excessivo, o que ilustra sua importância fisiológica na hemostasia. A exceção é a deficiência do fator XII, que não aumenta a tendência ao sangramento, apesar de prolongar os tempos de coagulação sanguínea *in vitro;* o mesmo acontece com seus cofatores, a pré-calicreína ou cininogênio de alto peso molecular (HMWK). Uma possível explicação para isso é apresentada a seguir.

O tempo de tromboplastina parcialmente ativada (APTT) avalia a via intrínseca

O termo "intrínseco" dá a entender que nenhum fator extrínseco, como fator tecidual ou trombina, é adicionado ao sangue além de um contato com uma "superfície" não endotelial. O teste clínico para essa via é o tempo de tromboplastina parcialmente ativada (APTT), também conhecido como tempo de coagulação caolim-cefalina (KCCT); visto que o caolim (argila microparticulada) é adicionado como uma "superfície" padrão e a cefalina (extrato fosfolipídico de cérebro), como um substituto para os fosfolipídios das plaquetas. A faixa normal do APTT é de aproximadamente 30-40 segundos; prolongações desse tempo são observadas nas deficiências dos fatores XII (ou seus cofatores, pré-calicreína ou HMWK), XI, IX (ou seu cofator, fator VIII), X (ou seu cofator, fator V) ou protrombina (fator II) (Tabelas 7.1 e 7.2).

O teste é utilizado para excluir as hemofilias congênitas comuns (deficiências dos fatores VIII, IX ou XI) e para monitorar o tratamento com heparina não fracionada. As

hemofilias causadas por deficiência dos fatores VIII ou IX ocorrem em cerca de 1 em 5.000 e 1 em 30.000 homens, respectivamente; a herança é recessiva ligada ao X, transmitida por mulheres portadoras. Em geral, o tratamento consiste em concentrados dos fatores VIII ou IX obtidos por tecnologia do DNA recombinante.

O tempo de protrombina avalia a via extrínseca

O termo "extrínseca" se refere ao efeito do fator tecidual, que (após se combinar com o fator VII da coagulação) acelera bastante a coagulação, por ativar tanto o fator IX quanto o fator X (Fig. 7.3). O fator tecidual é um polipeptídio que é expresso em todas as células, exceto nas células endoteliais. O teste clínico para essa via é o tempo de protrombina (PT), no qual o fator tecidual é adicionado ao plasma. A faixa normal é de aproximadamente 10-15 segundos; as prolongações desse tempo são observadas em deficiências dos fatores VII, X, V ou II. Na prática clínica, o teste é utilizado para diagnosticar tanto os defeitos congênitos raros desses fatores quanto, muito mais comumente, os distúrbios de sangramento adquiridos, resultantes de:

- **Deficiência de vitamina K**; por exemplo, na má absorção ou icterícia obstrutiva (Cap. 11), que reduz a síntese hepática dos fatores II, VII, IX e X. O tratamento é feito por administração oral ou intravenosa de vitamina K.
- **Administração de antagonistas orais da vitamina K**; por exemplo, varfarina, que reduz a síntese hepática desses fatores. O sangramento excessivo em pacientes em uso de varfarina pode ser tratado com a interrupção do uso do fármaco, administrando vitamina K ou substituindo os fatores II, VII, IX e X por concentrados do complexo de protrombina, contendo apenas os fatores relevantes (p. ex., Beriplex® ou plasma fresco congelado).
- **Doença hepática**, que reduz a síntese hepática desses fatores; por exemplo, o tempo de trombina é um marcador de prognóstico da falência do fígado após *overdose* de acetaminofeno (paracetamol) (Cap. 30). O tratamento consiste na reposição dos fatores II, VII, IX e X com plasma fresco congelado.



Quadro De Teste Clínico

Testes globais de coagulação

A **tromboelastografia (TEG)** e a **tromboelastometria rotacional (ROTEM)** avaliam a capacidade do sangue total de coagular em resposta a um estímulo mecânico, possibilitando a avaliação de todos os aspectos da hemostasia: função plaquetária, ligação cruzada da fibrina e fibrinólise.

O **teste de geração da trombina** é um teste global de coagulação que parece ser melhor que os testes de coagulação *standard* para avaliar a capacidade de um indivíduo coagular. Testes como o PT e o APTT, descritos anteriormente, medem apenas 5% do total de trombina gerada: i.e., no momento de geração do primeiro coágulo (Fig. 7.4).

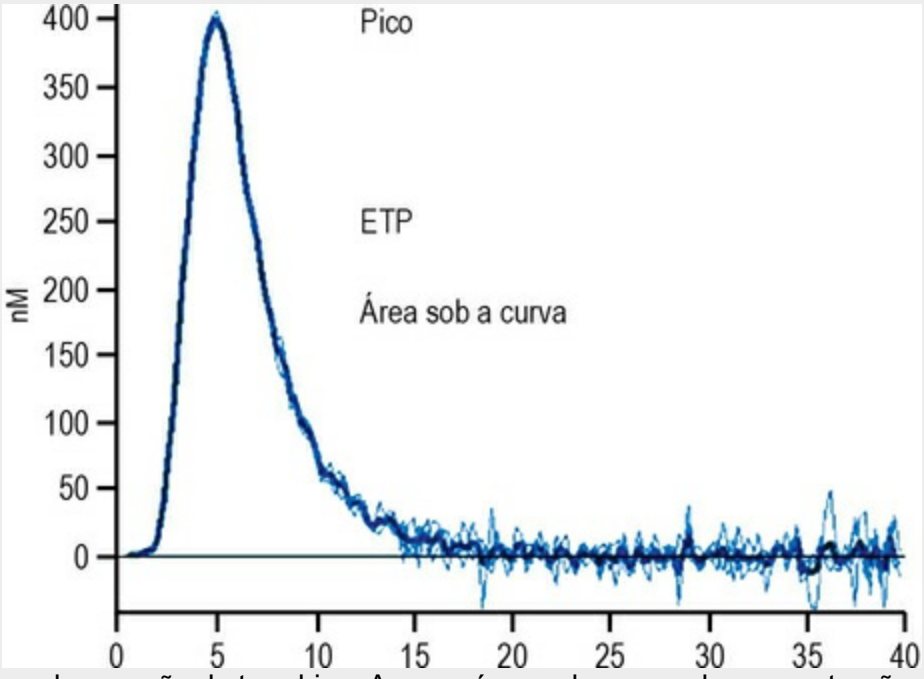


FIG. 7.4 Curva de geração de trombina. A curva é uma dosagem da concentração de trombina ao longo do tempo com os parâmetros tempo *lag*, tempo para o primeiro desenvolvimento de trombina, pico de trombina, quantidade máxima de trombina gerada, tempo para atingir o pico e potencial de trombina endógena (ETP) ou área sob a curva.

A trombina é central para a cascata de coagulação, na medida em que converte o fibrinogênio em fibrina e tem também inúmeros papéis de retroalimentação positiva e negativa. A dosagem da geração de trombina possibilita a quantificação, ao longo do tempo, de toda a trombina gerada em uma amostra de plasma pela sua capacidade de "cortar" ou um cromóforo ou um fluorocromo e medir a atividade cromogênica ou fluorescente resultante.

Apesar dos resultados promissores de ROTEM e de geração de trombina, ambos os testes são limitados por numerosas variáveis pré-analíticas e analíticas, que tornam difíceis as comparações entre laboratórios. Ainda não existe uma estandardização confiável destes testes com um controle de qualidade interno ou externo robusto. Por esse motivo, ambos permanecem como ferramentas de investigação.



Quadro Clínico

Menino com extensos hematomas: hemofilia clássica (deficiência congênita de fator viii)

Um menino de 3 anos foi admitido na sala de emergência do hospital local devido a inúmeros hematomas após uma queda de alguns degraus de escada. Um teste de triagem de coagulação de rotina mostrou APPT bastante prolongado, de mais de 150 seg (faixa normal, 30-40 seg.). A análise do fator VIII da coagulação mostrou um nível muito baixo; o nível de vWF foi normal. A mãe do menino relatou história familiar de sangramento excessivo afetando seu irmão e seu pai.

Comentário

Em virtude de sua história típica de um distúrbio de sangramento recessivo ligado ao X, nível baixo do fator VIII da coagulação e nível normal de vWF, foi diagnosticado como portador de deficiência congênita do fator VIII. A família foi encaminhada para o centro de hemofilia local e aconselhada a respeito dos riscos de ter outros filhos afetados e filhas portadoras. A criança foi tratada com concentrado de fator VIII recombinante intravenoso para o sangramento presente, e profilaticamente no futuro para prevenir episódios de sangramento adicionais.



Quadro De Teste Clínico

Monitoramento da terapia anticoagulante oral

A terapia anticoagulante oral com **antagonistas da vitamina K** (p. ex., a **varfarina**) é dada a longo prazo aos pacientes sob risco de trombose no interior das câmaras cardíacas, por exemplo pacientes com fibrilação atrial ou próteses valvares cardíacas, que podem embolizar para o cérebro, causando acidente vascular cerebral.

O monitoramento de um tempo de protrombina internacionalmente estandardizado (*i.e.*, o **índice internacional normalizado [INR]**) a cada poucas semanas é essencial para minimizar não apenas o risco de tromboembolismo, mas também de sangramento excessivo. Até 1% da população adulta nos países desenvolvidos recebe atualmente anticoagulantes a longo prazo; portanto, o monitoramento tradicional por médicos e enfermeiros (coletando amostras de sangue, enviando-as para o laboratório, obtendo resultados e dando instruções de dosagem aos pacientes) criou um volume de trabalho insustentável.

Nos últimos anos, testes de INR ao quase paciente ou ao paciente de cabeceira tornaram-se disponíveis para o monitoramento da varfarina, com uma amostra capilar obtida por "picada no dedo", sendo recolhida para um analisador de INR portátil. Com essa técnica, alguns pacientes podem se autotestar e, ocasionalmente, se automonitorar, de modo semelhante ao automonitoramento da glicose sanguínea pelas pessoas com diabetes. Algoritmos informatizados para a dosagem de varfarina foram também desenvolvidos para ajudar os profissionais de saúde a alterarem a dosagem com exatidão. Novos anticoagulantes orais para pacientes com fibrilação atrial (p. ex., o dabigatrano e o rivaroxaban, que não requerem monitoramento dos níveis de anticoagulação) foram recentemente introduzidos.

O tempo de coagulação da trombina avalia a via final comum

O termo "via final comum" refere-se à conversão da protrombina em trombina via Xa, com Va atuando como cofator

Esta, por sua vez, possibilita a conversão de fibrinogênio em fibrina. Essa etapa final de

produção de fibrina na via comum é testada clinicamente por meio do tempo de coagulação da trombina (TCT), no qual é adicionada trombina exógena ao plasma. A faixa normal de valores é de aproximadamente 10-15 segundos; são observadas prolongações na deficiência de fibrinogênio e na presença de inibidores, tais como heparina e produtos de degradação da fibrina. A deficiência em fibrinogênio pode ser congênita ou adquirida devido ao consumo de fibrinogênio na coagulação intravascular disseminada (CID), ou pode ocorrer após administração de fármacos fibrinolíticos (ver adiante). O tratamento é feito com crioprecipitado ou concentrados de fibrinogênio.

Vários testes avaliam a função plaquetária

Além de se avaliar o número, o tamanho e a morfologia das plaquetas por meio da análise da "contagem sanguínea completa" e do esfregaço sanguíneo, a função plaquetária pode ser avaliada de outras maneiras.

Um método de avaliação da função plaquetária é o ***Platelet Function Analyzer*** (PFA-100, Siemens). O sangue total passa em um cartucho contendo uma abertura revestida com uma combinação de dois agonistas plaquetários: por exemplo, colágeno/epinefrina ou colágeno/ADP. É medido o tempo necessário ao fecho da abertura como resultado da agregação plaquetária. Esse método não pode definir distúrbios específicos, mas um resultado anormal é sugestivo de um distúrbio plaquetário e pode ser usado como teste de triagem.

A **agregometria por transmissão de luz** (LTA) é considerada o padrão-ouro para investigar distúrbios específicos da função plaquetária. O plasma rico em plaquetas é exposto a vários agonistas plaquetários (p. ex., colágeno, ADP e epinefrina), e a transmissão de luz é monitorada para produzir curvas-padrão. O padrão de curvas obtido com uma combinação de agonistas pode ajudar a determinar que defeito de função plaquetária está presente.

A produção e a liberação de nucleotídios plaquetários (ou seja, ATP e ADP) podem ser medidas para avaliar a produção de nucleotídios e a liberação de nucleotídios a partir dos grânulos. A análise por citometria de fluxo de vários **receptores plaquetários** pode ser igualmente realizada.

Tal conjunto de testes deveria significar que os distúrbios de função plaquetária deveriam ser fáceis de diagnosticar. No entanto, as variáveis pré-analíticas e analíticas significam que os resultados podem frequentemente ser pouco confiáveis e que, muitas vezes, são difíceis de interpretar.

Trombina

A trombina converte o fibrinogênio circulante em fibrina e ativa o fator XIII, que forma as ligações cruzadas da fibrina, formando um coágulo

Acredita-se atualmente que a ativação da coagulação sanguínea seja iniciada normalmente pela lesão vascular, o que causa a exposição do fluxo sanguíneo ao fator

tecidual, resultando em ativação dos fatores VII e IX. Posteriormente, a ativação dos fatores X e II (protrombina) ocorre de preferência nos locais de lesão vascular, em conjunto com as plaquetas ativadas: as últimas fornecem atividade pró-coagulante como resultado da exposição dos fosfolipídios de superfície da membrana carregados negativamente (como a fosfatidilserina) e de locais de ligação de alta afinidade de vários fatores de coagulação ativados, possibilitando a formação dos complexos da protrombinase (Va, Xa e II) e tenase (VIIIa, IXa e Xa). Ambos potenciam consideravelmente a produção de trombina. Como resultado dessas interações bioquímicas, a formação de trombina e de fibrina é eficientemente localizada nos locais de lesão vascular.

A trombina tem um papel central na hemostasia

A trombina não apenas converte o fibrinogênio circulante em fibrina nos locais de lesão vascular, produzindo o tampão hemostático secundário rico em fibrina, mas também ativa o fator XIII (transglutaminase), que faz ligações cruzadas com a fibrina, tornando-a resistente à dispersão pela pressão sanguínea local ou pela fibrinólise (Figs. 7.1 e 7.3). Além disso, a trombina estimula sua própria formação em um ciclo de retroalimentação positivo de três maneiras:

- **Catalisa a ativação do fator XI:** isso pode explicar por que as deficiências congênitas de fator XII, pré-calicreína ou HMWK não estão associadas ao sangramento excessivo (Fig. 7.3)
- **Catalisa a ativação dos fatores VIII e V**
- **Ativa as plaquetas** (Fig. 7.2).

Inibidores da trombina foram desenvolvidos como fármacos anticoagulantes

Agora que foi reconhecido o papel central da trombina na hemostasia e trombose, vários inibidores diretos da trombina (IDTs) foram desenvolvidos como fármacos anticoagulantes. Em grandes ensaios clínicos controlados randomizados, foi demonstrado que o dabigatrano, um inibidor direto da trombina oral (IDT), é tão eficaz quanto a varfarina no tratamento da trombose venosa aguda e na prevenção de infarto em pacientes com fibrilação atrial. A maior vantagem desse fármaco para essas indicações é a de que não é necessário o monitoramento da dose. No Reino Unido, obteve-se recentemente uma licença para a prevenção de infarto na fibrilação atrial. Contudo, não existe um antídoto eficaz até a data e, por esta razão, está a ser introduzido na prática clínica com precaução.

O argatroban é outro IDT oral que constitui uma alternativa eficaz à heparina quando esta é contraindicada após um episódio de trombocitopenia induzida por heparina (TIH). Recentemente, foi concedida uma licença no Reino Unido para esta indicação. A bivalirudina, um derivado da hirudina, obtida originalmente a partir da sanguessuga medicinal *Hirudo medicinalis*, é um IDT parenteral que revelou ser eficaz no tratamento de síndromes coronárias agudas. É também uma alternativa à heparina para pacientes com síndromes coronárias agudas que tenham TIH.

Esse papel central da trombina explica a investigação intensiva que está sendo

atualmente realizada para refinar o teste de geração de trombina e o aplicar tanto a patologias clínicas de sangramento como trombóticas.

Os inibidores da coagulação são essenciais para evitar a formação excessiva de trombina e a ocorrência de trombose

Foram identificados três sistemas de inibidores da coagulação que ocorrem naturalmente (Fig. 7.5 e Tabela 7.3).

Tabela 7.3

Propriedades dos inibidores da coagulação

Inibidor (sinônimo)	Peso molecular (Da)	Concentração plasmática (mg/dL)
Antitrombina (antitrombina III)	65.000	18-30
Proteína C	56.000	0,4
Proteína S	69.000	2,5
Inibidor da via do fator tecidual, TFPI (inibidor da coagulação associado à lipoproteína, LACI)	32.000	0,1

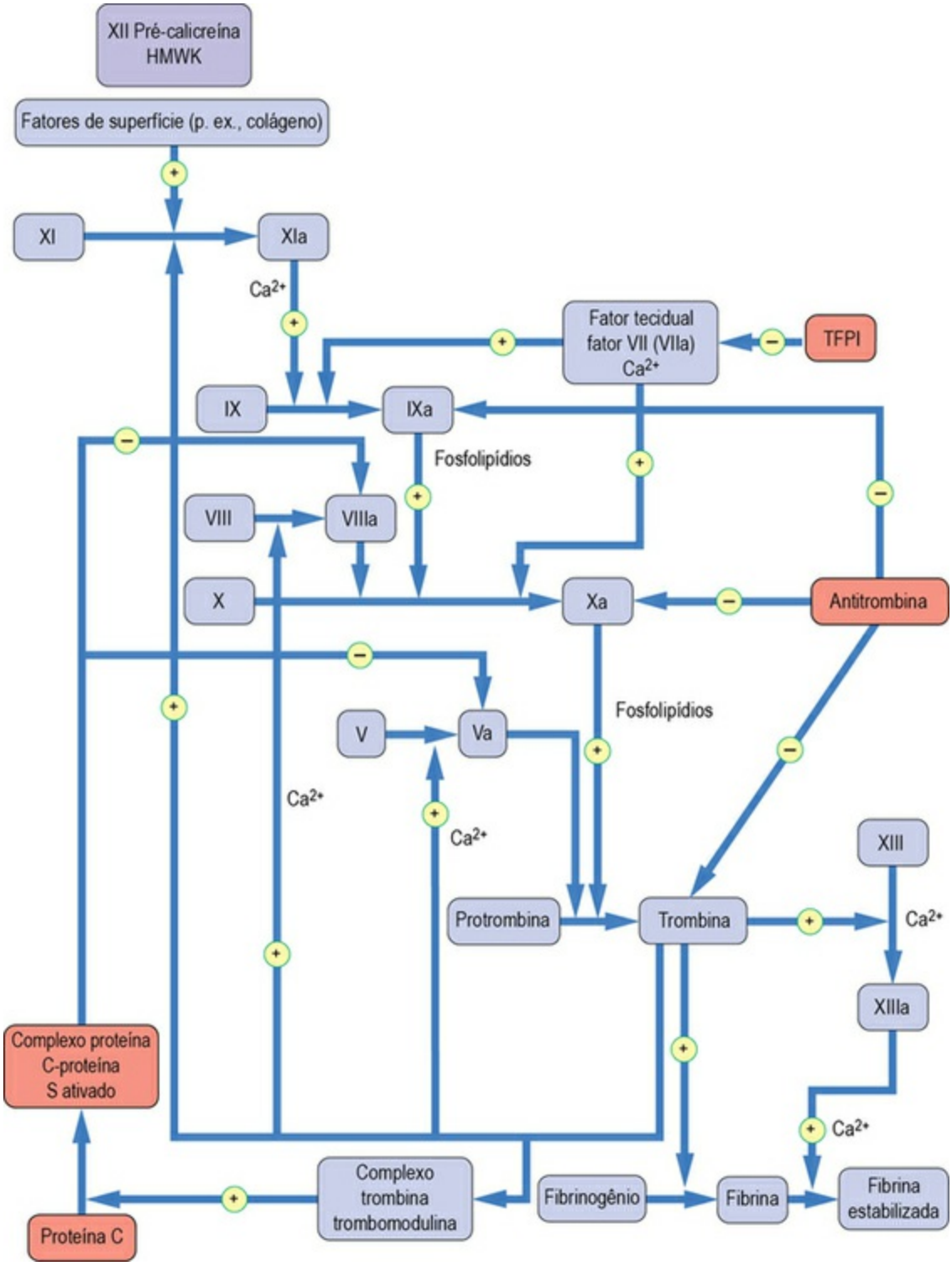


FIG. 7.5 Locais de ação dos inibidores da coagulação sanguínea. Antitrombina, proteína C e proteína S, e inibidor da via do fator tecidual (TFPI).

- **Antitrombina:** proteína sintetizada no fígado. Sua atividade é catalisada pelo fármaco antitrombótico heparina (heparinas não fracionada e de baixo peso molecular) e pelos glicosaminoglicanos endógenos, semelhantes à heparina (GAG), que estão presentes na superfície das células endoteliais vasculares. Ela não inativa apenas a trombina, mas também os fatores IXa e Xa (Fig. 7.5). Como resultado, a deficiência congênita de antitrombina resulta em risco aumentado de tromboembolismo venoso.
- **Heparinas** são referidas como inibidores indiretos do fator Xa devido ao seu aumento da atividade da antitrombina. São usadas tanto no tratamento como na prevenção da trombose venosa aguda, geralmente na forma de uma heparina de baixo peso

molecular (LMWH); por exemplo, enoxaparina ou dalteparina. Em geral, são substituídas por anticoagulantes orais, como a varfarina, para a anticoagulação a longo prazo. As LMWH também têm um papel no controle da trombose arterial aguda, visto que ela pertence às síndromes coronárias agudas; por exemplo, enoxaparina ou fondaparinux.

- **Inibidores diretos do fator Xa** têm sido agora desenvolvidos como anticoagulantes. O rivaroxaban demonstrou ser uma alternativa eficaz à varfarina no tratamento e prevenção da trombose venosa e na prevenção de infarto em pacientes com fibrilação atrial. O apixaban está autorizado na prevenção de tromboses venosas em pacientes sujeitos a artroplastias totais do joelho ou anca. Ensaios também demonstraram que ele é eficaz na prevenção de infarto tromboembólico em pacientes com fibrilação atrial. Ambas as medicações são na forma oral e não é necessário monitoramento de seu efeito anticoagulante. No entanto, atualmente não existe um antídoto eficaz.
- **Proteína C e seu cofator, proteína S:** são proteínas dependentes de vitamina K, sintetizadas no fígado. Quando a trombina é formada, ela se liga à trombomodulina (peso molecular 74 kDa) que está presente na superfície das células endoteliais vasculares. O complexo trombina-trombomodulina ativa a proteína C, que forma um complexo com o seu cofator, a proteína S. Esse complexo degrada seletivamente os fatores Va e VIIIa através de proteólise limitada (Fig. 7.5). Portanto, essa via forma uma retroalimentação negativa na geração de trombina. Deficiências congênitas de proteína C ou proteína S resultam em um risco maior de tromboembolismo venoso; outra causa de aumento do risco de tromboembolismo venoso é uma mutação no fator V da coagulação (fator V de Leiden), que confere resistência à sua inativação pela proteína C ativada. Essa mutação é comum, ocorrendo em aproximadamente 5% da população nos países ocidentais.
- **Inibidor da via do fator tecidual (TFPI):** essa proteína é sintetizada no endotélio e no fígado; circula ligada a lipoproteínas. Ela inibe o complexo fator tecidual VIIa (Fig. 7.5). Ao contrário, a deficiência de TFPI não parece aumentar o risco de trombose.



Quadro Clínico

Homem de 40 anos com dor e inchaço nas pernas: deficiência de antitrombina

Um homem de 40 anos foi admitido na sala de emergência do hospital local devido a uma dor aguda e inchaço na perna esquerda, 10 dias após uma cirurgia importante. As imagens da perna por ultrassonografia confirmaram a oclusão da veia femoral esquerda por trombo.

Comentário

O paciente foi prescrito com terapia anticoagulante com heparina de baixo peso molecular nas doses padrão. O paciente relatou forte história familiar de "coágulos nas

pernas" em idade precoce. Iniciou varfarina e LMWH, sendo a segunda interrompida quando seu INR era > 2. Foi acompanhado em uma clínica de anticoagulação e especialista em trombofilia para controle de longo prazo.

Fibrinólise

O sistema fibrinolítico atua limitando a formação excessiva de fibrina através de fibrinólise mediada pela plasmina

O sistema de coagulação atua para formar a fibrina; o sistema fibrinolítico atua para limitar a formação excessiva de fibrina (tanto intra como extravascular) através de fibrinólise mediada por plasmina. O plasminogênio circulante se liga à fibrina por locais de ligação à lisina; ele é convertido em plasmina ativa por ativadores do plasminogênio. O ativador do plasminogênio tecidual (tPA) é sintetizado por células endoteliais; ele geralmente circula no plasma em concentrações basais baixas (5 ng/mL), porém é liberado no plasma por estímulos que incluem oclusão venosa, exercícios e epinefrina. Junto com o plasminogênio, liga-se fortemente à fibrina, o que estimula sua atividade (o K_m para o plasminogênio diminui de 65 para 0,15 μmol/L na presença de fibrina), direcionando, assim, a atividade da plasmina para os depósitos de fibrina.



Quadro De Teste Clínico

Medição dos dímeros d de fibrina no diagnóstico de suspeita de trombose venosa profunda

Os **dímeros D de fibrina** (um produto de degradação da fibrina com ligações cruzadas e um marcador de renovação de fibrina) estão presentes no sangue normalmente em concentrações menores que 250μmg/L. Na **trombose venosa profunda da perna (DVT)**, a deposição de uma grande massa de fibrina com ligações cruzadas no interior das veias da perna, seguida de lise parcial pelo sistema fibrinolítico do corpo, aumenta a renovação de fibrina, e os níveis de dímeros D no sangue se mostram elevados. Muitos pacientes são atendidos nos serviços de emergência com a perna inchada e/ou dolorida, o que pode ser devido à DVT.

Imunoensaios rápidos para a detecção de dímeros D no sangue podem ser realizados no serviço de emergência e são agora amplamente utilizados como complemento do diagnóstico clínico. Aproximadamente 1/3 dos pacientes com suspeita clínica de DVT apresenta níveis normais de dímeros D, o que, em combinação com uma baixa pontuação clínica, normalmente exclui o diagnóstico e pode permitir a dispensa rápida desses pacientes sem a necessidade de investigação adicional ou tratamento. Em pacientes com níveis elevados de dímeros D, o tratamento com heparina é iniciado, e um exame de imagem da perna é realizado (normalmente por ultrassonografia) para confirmar a presença e a extensão da DVT.

Os inibidores da plasmina evitam a atividade fibrinolítica excessiva

A atividade excessiva de tPA no plasma costuma ser evitada por um excesso do seu principal inibidor, o inibidor 1 do ativador do plasminogênio (PAI-1), que é sintetizado tanto por células endoteliais como pelos hepatócitos. O ativador de plasminogênio urinário (uPA) circula no plasma tanto na forma precursora de cadeia simples ativa (scuPA, pró-urocinase) quanto na forma de cadeia dupla mais ativa (tcuPA, urocinase). Um ativador da scuPA é o fator XII da coagulação ativado na superfície que, portanto, liga os sistemas de coagulação e fibrinolítico. Os principais componentes do sistema fibrinolítico estão ilustrados na Tabela 7.4 e na Figura 7.6. A formação excessiva de plasmina normalmente é prevenida por:

Tabela 7.4

Componentes do sistema fibrinolítico

Componente (sinônimo)	Peso molecular (Da)	Concentração plasmática (mg/dL)
Plasminogênio	92.000	0,2
Ativador de plasminogênio, tPA	65.000	5 (basal)
Ativador de plasminogênio urinário, uPA	54.000	20
Inibidor 1 do ativador de plasminogênio, PAI-1	48.000	200
Antiplasmina (α_2-antiplasmina)	70.000	700

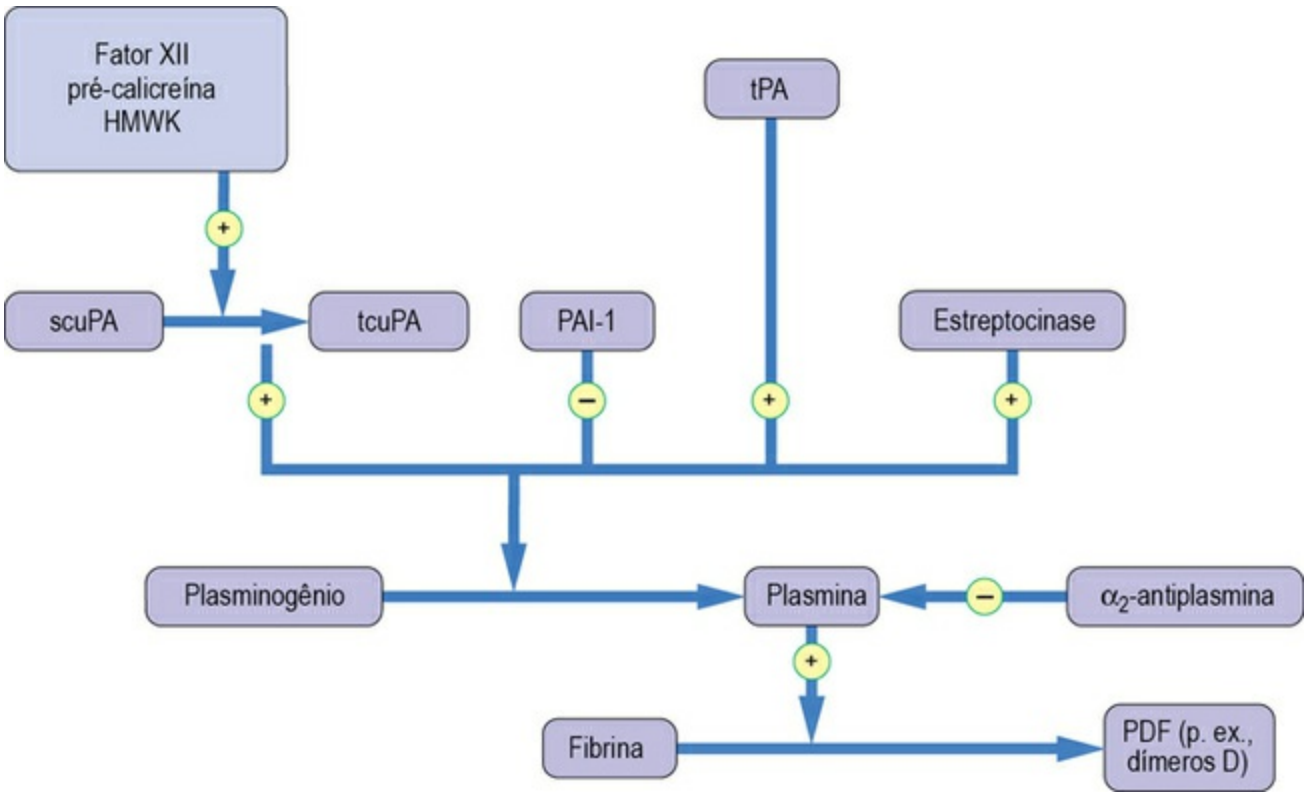


FIG. 7.6 O sistema fibrinolítico. O plasminogênio pode ser ativado à plasmina pela uPA (urocinase), pelo tPA ou pela estreptocinase. A uPA e o tPA são inibidos pelo inibidor 1 do ativador de plasminogênio (PAI-1). A plasmina é inibida pela antiplasmina. A plasmina degrada a fibrina em produtos de degradação da fibrina (PDF). HMWK, cininogênio de alto peso molecular; scuPA, pró-urocinase; tcuPA, urocinase; tPA, ativador do plasminogênio tecidual.

- Ligação de 50% de plasminogênio à glicoproteína rica em histidina (HRG)
- Rápida inativação de plasmina livre por seu principal inibidor, a α_2-antiplasmina.

A importância fisiológica do PAI-1 e da α_2-antiplasmina é ilustrada pelo aumento da tendência ao sangramento que está associado aos casos raros de suas deficiências congênitas (Tabela 7.1); a atividade excessiva de plasmina no plasma, resultante das deficiências, tem o efeito de lisar os tampões hemostáticos.

Quadro Clínico

Tratamento antitrombótico na síndrome coronária aguda

A oclusão de uma artéria coronária por trombos provoca as características da síndrome coronária aguda, que incluem alterações eletrocardiográficas e bioquímicas. O **infarto agudo do miocárdio** refere-se à morte permanente da parte do músculo cardíaco que é irrigada pela artéria. Em síndromes coronárias agudas, incluindo o infarto agudo do miocárdio, o paciente costuma sentir **dor intensa no peito.**

A Aspirina® e a heparina são geralmente dadas no infarto agudo do miocárdio e outras síndromes coronárias agudas, para inibir os componentes plaquetas e fibrina do trombo arterial coronário em desenvolvimento. Alguns pacientes podem requerer a adição de clopidogrel e/ou inibidores de GPIIb-IIIa.

Muitos pacientes com infarto agudo do miocárdio em evolução são candidatos para

tratamento trombolítico com um fármaco ativador do plasminogênio, administrado intravenosamente. A rápida trombólise dissolve o trombo arterial coronário, reduz o tamanho do infarto e diminui o risco de complicações, incluindo a morte e a falha cardíaca. Contudo, em anos recentes, a remoção direta do trombo **(intervenção coronária percutânea [ICP])** é aplicada em lugar da terapia trombolítica, uma vez que parece proporcionar resultados favoráveis à trombólise e não aumenta o risco de sangramento (p. ex., para o cérebro). Os pacientes sujeitos a ICP devem receber adicionalmente um inibidor de GPIIb-IIIa.

Resumo

- A hemostasia é constituída de vários processos que protegem o corpo contra a perda de sangue.
- A lesão da parede do vaso sanguíneo estabelece um fenômeno dinâmico complexo que envolve as plaquetas sanguíneas (ativação, adesão, agregação) e uma cascata de fatores de coagulação, classificada como vias intrínseca, extrínseca e final comum.
- A integridade desses três sistemas pode ser avaliada por testes laboratoriais simples. Os testes globais de coagulação, como a geração de trombina e a tromboelastografia, atualmente usados em investigação, podem ser mais eficazes na avaliação do fenótipo de coagulação de um indivíduo.
- Deficiências dos fatores que participam da cascata de coagulação e/ou função inadequada das plaquetas resultam em distúrbios de sangramento.
- Eventualmente, os coágulos sanguíneos são degradados pelo sistema fibrinolítico. O processo de fibrinólise impede os fenômenos trombóticos e geralmente há um equilíbrio entre hemostasia e trombose.
- A Aspirina® e a heparina são utilizadas em pacientes com infarto agudo do miocárdio ou outras síndromes coronárias agudas.
- A Aspirina® (ou outro agente antiplaquetário) é também utilizada para reduzir o risco de recorrência de infarto agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral.
- Os fármacos anticoagulantes (p. ex., heparina, varfarina ou rivaroxabana) são utilizados no tratamento de trombose venosa aguda ou embolia.
- Os fármacos anticoagulantes (p. ex., varfarina, dabigatran e rivaroxabana) são utilizados, a longo prazo, para prevenir o tromboembolismo do coração (fibrilação atrial, próteses de válvulas cardíacas).

Questões para aprendizagem

Teste seus conhecimentos

1. Quando um paciente apresenta sangramento excessivo em múltiplos locais, quais testes laboratoriais estão disponíveis para identificar a causa provável de seu defeito hemostático?
2. Quando um paciente apresenta a perna inchada e dolorida, possivelmente devido à trombose venosa profunda (DVT), quais testes laboratoriais podem ser realizados para ajudar o clínico a:

- Estabelecer ou excluir esse diagnóstico?
- Monitorar o tratamento com anticoagulante após confirmação do diagnóstico?

3. Quando um paciente apresenta trombose coronária aguda (evoluindo para infarto agudo do miocárdio), quais fármacos antitrombóticos deveriam ser urgentemente considerados para reduzir o risco de complicações?

Leituras sugeridas

Ozaki Y, editor: State of the art 2011, *J Thromb Haemostas* 9(suppl s1):1-395, 2011.

Mannucci, P. M., Levi, M. Prevention and treatment of major blood loss. *N Engl J Med*. 2007; 356:2301–2311.

Weitz, J. I., et al. New antithrombotic drugs. *Chest*. 2012; 141(Suppl 2):e120S–e151S.

Sites

Anaesthesia UK: Tests of coagulation. www.frca.co.uk/article.aspx?articleid=100101.

International Society on Thrombosis and Haemostasis. www.isth.org.

Walker H.K., Hall W.D., Hurst J.W., eds. Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations. ed 3. Butterworths, Boston, 1990. www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK265/

Wright IS: The nomenclature of blood clotting factors, *Can Med Assoc J* 86:373-374, 1962. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1848865/?page=1.

CAPÍTULO 8

Membranas e Transporte

Masatomo Maeda

Objetivos

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever as diferenças entre os sistemas de transporte passivo e ativo mediado por carreador.
- Descrever as características básicas dos canais e poros de membrana.
- Dar vários exemplos específicos de sistemas de transporte de íons e substrato, incluindo sistemas acoplados de transporte.
- Descrever várias doenças características resultantes de defeitos no transporte de membrana.

Introdução

As biomembranas não são rígidas ou impermeáveis, mas estruturas altamente móveis e dinâmicas

A membrana plasmática é o porteiro da célula. Ela controla não somente o acesso de íons inorgânicos, vitaminas e nutrientes, mas também a entrada de fármacos e a saída de produtos da eliminação. As proteínas integrais transmembrana têm papéis importantes no transporte dessas moléculas através da membrana e frequentemente mantêm os gradientes de concentração por meio das membranas. As concentrações de K^+, Na^+ e Ca^{2+} no citoplasma são mantidas em ~140, 10 e 10^{-4} mmol/L, respectivamente, pelas proteínas transportadoras, enquanto aquelas do lado extracelular (no sangue) são ~5, 145 e 1-2 mmol/L, respectivamente. A força de direcionamento para o transporte dos íons e a manutenção dos gradientes iônicos é fornecida direta ou indiretamente pelo ATP. As propriedades transportadoras da membrana serão ilustradas por vários exemplos importantes.

Tipos de processos de transporte

Difusão simples através da bicamada fosfolipídica

Algumas moléculas pequenas e neutras podem atravessar as biomembranas por difusão simples

Pequenas moléculas não polares (tais como O_2, CO_2, N_2) e moléculas polares não carregadas (tais como ureia, etanol e pequenos ácidos orgânicos) se movem através das membranas por difusão simples sem o auxílio das proteínas de membrana (Tabela 8.1 e Fig. 8.1A). A direção do movimento dessas espécies sempre é "descendente", ao longo do gradiente de concentração, do mais concentrado para o menos concentrado, e assim estabelece o equilíbrio.

Tabela 8.1

Sistemas de transporte das biomembranas

Tipo		Exemplo	Proteína de transporte	Gasto de energia	Especificidade	Saturabilidade	Taxa (moléculas/proteín transportadas)
Transporte passivo ou difusão	Difusão simples		–	–	–	–	
	Difusão facilitada		+	–	+	+	
	Transportador	GLUT-1-5					-10^2
	Canal	H_2O, Na^+, K^+, Ca^{2+}, Cl^-					10^7-10^8
Transporte ativo	Primário	Bombas de prótons	+	+	+	+	10^2-10^4
	Secundário	Transportadores ABC	+	+	+	+	10^0-10^{2**}
	Simporte	SGLT-1, 2, aminoácidos neutros					
	Antiporte	Cl^-/HCO_3^-, Na^+/Ca^{2+}, Na^+/H^+					
	Uniporte	Glutamato					

Os sistemas de transporte são classificados de acordo com o papel das proteínas de transporte e gasto de energia. Substratos típicos para vários tipos de canais são mostrados em parênteses.

*O antiporte Cl^-/HCO_3^- parece ser uma exceção aos sistemas de transporte ativo secundários, porque sua taxa de transporte é alta, a 10^5 moléculas/proteínas transportadas.

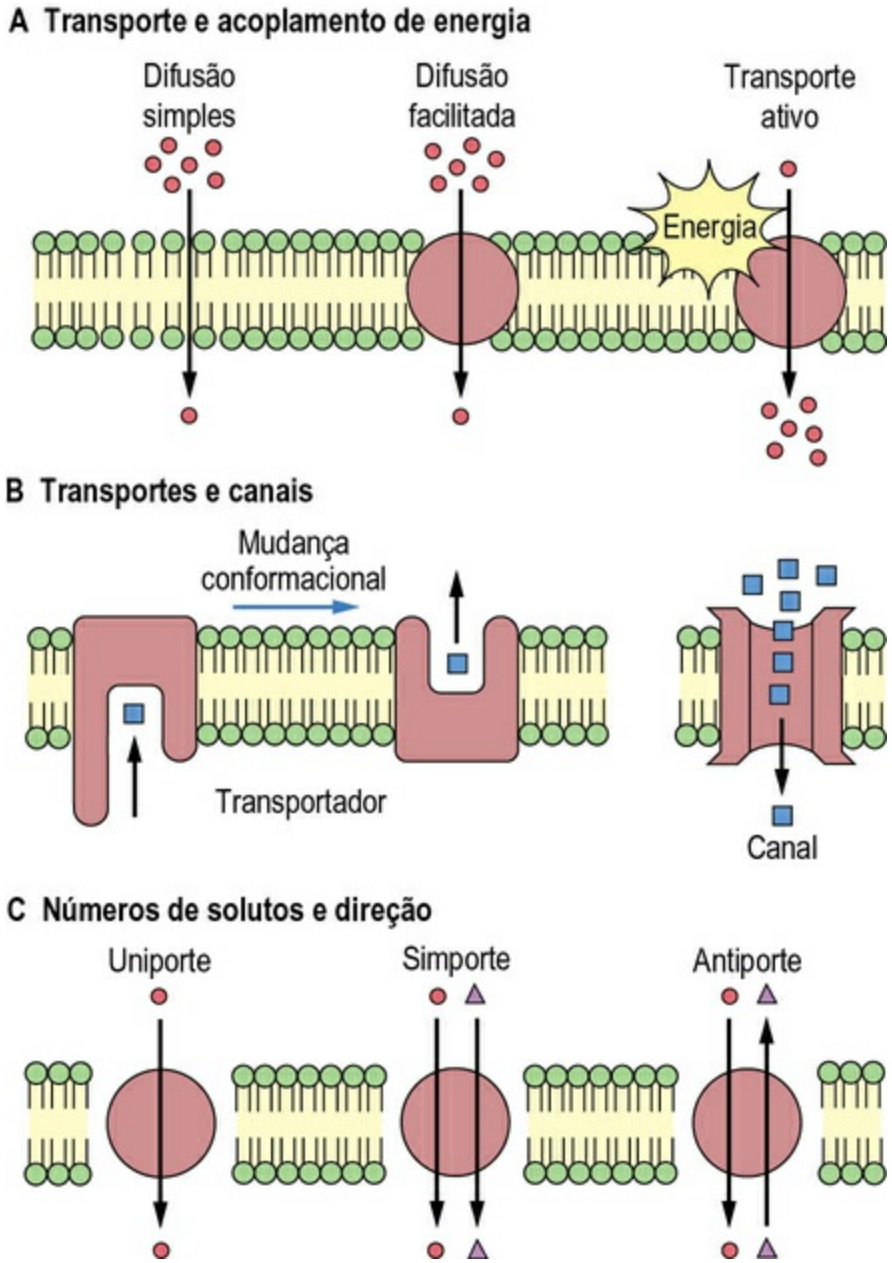


FIG. 8.1 Vários modelos de movimento de soluto através das membranas.

A hidrofobicidade das moléculas é uma importante condição para que ocorra a difusão simples através da membrana, visto que o interior da bicamada lipídica é hidrofóbico. A taxa de transporte dessas moléculas é, de fato, intimamente relacionada com seus **coeficientes de partição** entre óleo e água.

Embora moléculas de água possam ser transportadas por difusão simples, acredita-se que as proteínas-canal (ver adiante) controlem o movimento de água através da maioria das membranas, especialmente nos rins para a concentração da urina. Uma mutação no gene da proteína-canal de água (aquaporina-2) causa diurese em alguns pacientes com **diabetes insípido nefrogênico**, uma doença caracterizada por urina excessiva, mas sem a hiperglicemia característica do diabetes melito (Cap. 23).

Quadro de conceitos avançados

Antibióticos e permeabilidade da membrana

Antibióticos agem como ionóforos e aumentam a permeabilidade das membranas a íons específicos; os efeitos bactericidas dos ionóforos são atribuídos a distúrbio dos sistemas de transporte iônicos da membrana bacteriana. Os ionóforos permitem o movimento de íons somente a favor de seus gradientes eletroquímicos. Existem duas classes de ionóforos: carreadores iônicos móveis (carreadores aprisionados) e formadores de canais (Fig. 8.2).

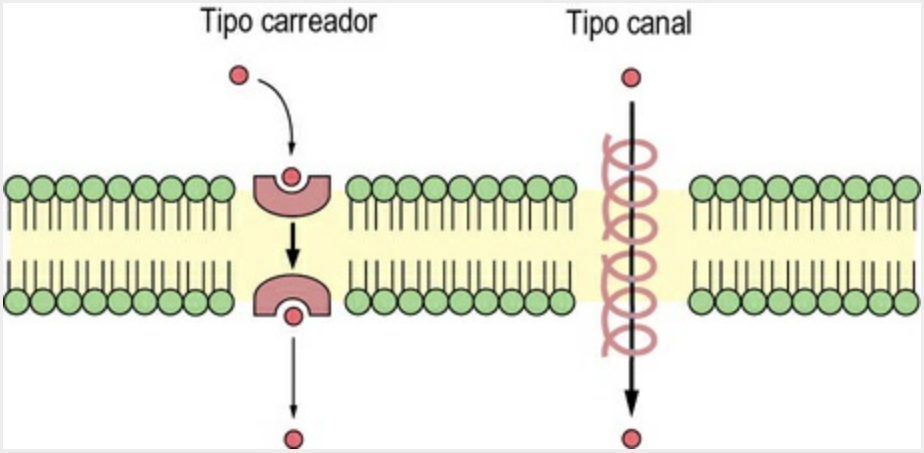


FIG. 8.2 Carreadores iônicos móveis e ionóforos formadores de canal.
Os ionóforos possibilitam movimento de íons somente a favor de seus gradientes eletroquímicos.

A valinomicina é um exemplo típico de carreador iônico móvel. É um peptídio cíclico com exterior lipofílico e interior iônico. Ela se dissolve na membrana e se difunde entre as superfícies interna e externa. O K^+ se liga no núcleo central da valinomicina, e o complexo se difunde pela membrana, liberando o K^+ e gradualmente dissipando o gradiente de K^+. O carreador tipo ionóforo, nigericina e monensina, troca H^+ por Na^+ e K^+, respectivamente. A ionomicina e o A23187 são ionóforos de Ca^{2+}.

A molécula A da β-hélice da gramicidina, um peptídio linear com 15 resíduos de aminoácidos, forma um poro. O dímero "cabeça a cabeça" da gramicidina A forma um canal transmembrana que possibilita o movimento de cátions monovalentes (H^+, Na^+ e K^+).

Os antibióticos poliênicos como a anfotericina B e a nistatina exercem sua ação citotóxica por tornar a membrana da célula-alvo permeável aos íons e às pequenas moléculas. A formação de complexo esterol-polieno é essencial para a função citotóxica desses antibióticos, visto que eles exibem ação seletiva contra organismos nos quais as membranas contêm esteróis. Então, eles são ativos contra leveduras, grande variedade de fungos e outras células eucarióticas, mas não têm efeito em bactérias. Pelo fato de sua afinidade pelo ergosterol (um componente da membrana dos fungos) ser maior que pelo colesterol, esses antibióticos têm sido usados para o tratamento de infecções tópicas de origem fúngica.

Transporte mediado por proteínas de membrana

As proteínas de membrana são necessárias ao transporte de moléculas maiores através das biomembranas

O transporte de grandes moléculas polares, tais como aminoácidos ou açúcares, para dentro da célula, requer o envolvimento de proteínas de membrana conhecidas como transportadoras, também chamadas portadoras, permeases, translocases ou proteínas carreadoras. O termo "carreador" também é aplicado aos ionóforos, os quais se movem passivamente através da membrana junto com o íon ligado (Fig. 8.2). Os transportadores são tão específicos quanto as enzimas o são para os substratos, e trabalham por um de dois mecanismos: **difusão facilitada** ou **transporte ativo.** A difusão facilitada catalisa o movimento de um substrato através da membrana a favor de um gradiente de concentração e não necessita de energia. Ao contrário, o transporte ativo é um processo no qual os substratos são transportados para cima, contra seu gradiente de concentração. O transporte ativo deve ser acoplado a uma reação com produção de energia (Fig. 8.1A).

Saturabilidade e especificidade são características importantes dos sistemas de transporte de membrana

Em geral, a taxa da difusão facilitada é muito maior que a da difusão simples: as proteínas de transporte catalisam o processo de transporte. Ao contrário da difusão simples, na qual a taxa de transporte é diretamente proporcional à concentração do substrato, a difusão facilitada é um processo saturável, tendo uma taxa de transporte máximo, $T_{máx}$ (Fig. 8.3). Quando a concentração das moléculas extracelulares (substratos de transporte) se torna muito alta, o $T_{máx}$ é alcançado pela saturação das proteínas de transporte com o substrato. A cinética da difusão facilitada para os substratos pode ser descrita pelas mesmas equações que são usadas para a catálise de enzimas (p. ex., equações do tipo Michaelis-Menten e Lineweaver-Burk) (Cap. 6):

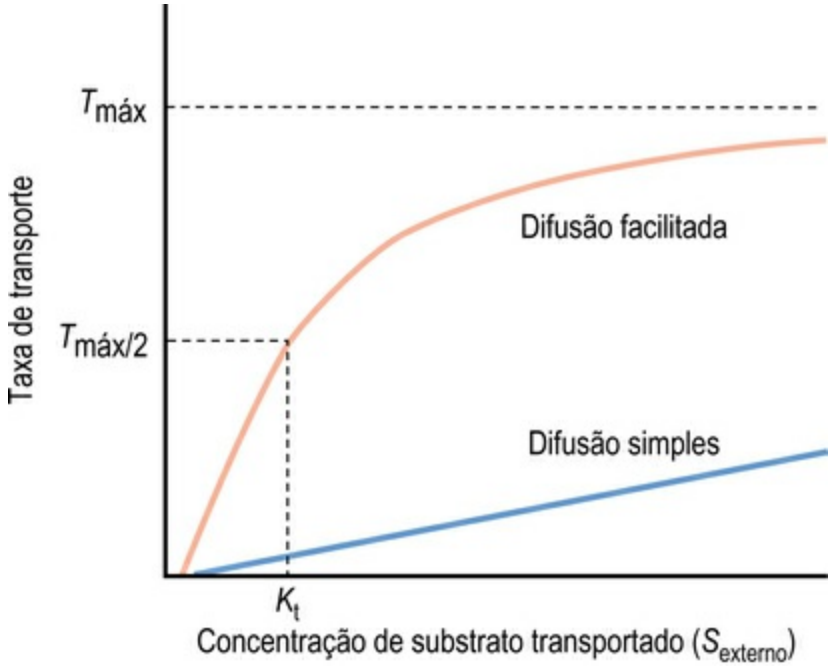


FIG. 8.3 Comparação das cinéticas de transporte da difusão facilitada e da difusão simples. A taxa de transporte do substrato é plotada contra a concentração de substrato no meio extracelular. Em comum com a catálise enzimática, a absorção catalisada por transportados tem uma taxa de transporte máximo, $T_{máx}$ (saturável). K_t é a concentração na qual a taxa de absorção do substrato é metade da máxima. Para a difusão simples, a taxa de transporte é mais lenta e diretamente proporcional à concentração do substrato.

$$S_{externo} + \text{transportador} \underset{}{\overset{K_t}{\rightleftharpoons}} (S\text{·complexo transportador}) \rightarrow S_{interno}$$

Em que K_t é a constante de dissociação do complexo substrato-transportador e $S_{externo}$ é a concentração do substrato transportado. Então, a taxa de transporte, t, pode ser calculada como:

$$t = \frac{T_{max}}{1 + \frac{K_t}{S_{out}}}$$

Em que o K_t é a concentração que dá a metade da taxa de transporte máxima. O K_t para um transportador conceitualmente é o mesmo que para o K_m para uma enzima (Cap. 6).

O processo de transporte com frequência altamente específico: cada transportador leva somente uma única espécie de moléculas ou compostos estruturalmente relacionados. O transportador GLUT-1 das hemácias tem alta afinidade pela d-glicose, mas uma afinidade 10-20 vezes menor para os açúcares relacionados, d-manose e d-galactose. O enantiômero l-glicose não é transportado; seu K_t é mais que 1.000 vezes maior que o da forma D.

Quadro clínico

Cistinose

Uma criança de 18 meses apresentou poliúria, falha no crescimento e um episódio de desidratação grave. O teste de urina apresentou glicosúria e proteinúria, com outras análises bioquímicas mostrando aminoacidúria generalizada e fosfatúria.

Comentário

Trata-se de uma apresentação clássica de cistinose infantil, resultante de acúmulo de cistina nos lisossomos em virtude de defeito na proteína de transporte lisossomal, cistinosina. A cistina é fracamente solúvel, e um precipitado cristalino se forma nas células por todo o corpo. Experimentos *in vitro* com carga de cistina mostraram que as células do túbulo proximal renal se tornam depletadas de ATP, resultando em lesão das bombas de íons dependentes de ATP com consequente desbalanço de eletrólitos e perda de metabólitos.

O tratamento com cisteamina aumenta o transporte de cistina dos lisossomos, retardando o declínio na função renal. A cisteamina é uma base fraca; ela forma um dissulfeto misto com a cisteína, o qual é então secretado através de um transportador catiônico de aminoácidos. Se não tratada, a falência renal ocorre entre 6-12 anos de idade. Lamentavelmente, existe mais acúmulo de cistina no sistema nervoso central, apesar da terapia, com dano neurológico a longo prazo.

Quadro clínico

Doença de hartnup

Um menino de 3 anos passou o feriado na Espanha e desenvolveu erupções de pele do tipo pelagra na face, pescoço, antebraços e porção dorsal das mãos e pernas. Sua pele se tornou escamosa, áspera e hiperpigmentada. A criança foi levada ao GP reclamando de dores de cabeça e fraqueza. A urinálise demonstrou maciça hiperaminoacidúria de ácidos monoamino-monocarboxílicos neutros (p. ex., alanina, serina, treonina, asparagina, glutamina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, tirosina, triptofano, histidina e citrulina).

Comentário

Esses aminoácidos compartilham um transportador comum, o qual é expresso somente na borda luminal das células epiteliais nos túbulos renais e epitélio intestinal. A dermatite do tipo pelagra (Cap. 11) e o envolvimento neurológico se parecem com a deficiência nutricional de niacina. A ingestão reduzida de triptofano resulta em produção reduzida de nicotinamida. A doença é tratada com nicotinamida oral e aplicação de protetor solar nas áreas expostas.

Características dos transportadores de glicose (uniportes)

Os transportadores de glicose catalisam o transporte de glicose para o interior e para o exterior das células

Os transportadores de glicose são essenciais para a difusão facilitada de glicose para dentro das células. A família GLUT de transportadores de glicose inclui do GLUT-1 ao GLUT-5 (Tabela 8.2) e outros. São proteínas transmembrana similares em tamanho, todas tendo cerca de 500 resíduos de aminoácidos e 12 hélices transmembrana. O GLUT-1, nas hemácias, tem o K_m de ~2 mmol/L. O transportador GLUT-1 opera em cerca de 40% do $T_{máx}$ sob condições de jejum (concentração de glicose no sangue de 5 mmol/L; 90 mg/dL); esse nível de atividade é suficiente para alcançar as necessidades das hemácias (Cap. 12). Em contraste, as células β das ilhotas pancreáticas expressam GLUT-2, com K_m maior que 10 mmol/L (180 mg/dL). Em resposta à ingestão de alimento e ao aumento resultante na concentração de glicose sanguínea, as moléculas de GLUT-2 respondem aumentando a entrada de glicose nas células β, estimulando a secreção de insulina (Cap. 21). As células nos tecidos sensíveis à insulina, como o músculo e o tecido adiposo, têm o GLUT-4. A insulina estimula a translocação do GLUT-4 das vesículas intracelulares para a membrana plasmática, facilitando a entrada de glicose durante as refeições.

Tabela 8.2
Classificação dos transportadores de glicose

Transportador	K_t para transporte de d-glicose (mmol)	Substrato	Principais locais de expressão
Difusão facilitada (uniporte) (transporte passivo)			
GLUT-1	1-2	Glicose, galactose, manose	Eritrócito, barreiras sangue-tecido
GLUT-2	15-20	Glicose, frutose	Fígado, intestino, rins, células β pancreáticas, cérebro
GLUT-3	1,8*	Glicose	Ubíquo
GLUT-4	5	Glicose	Músculos esquelético e cardíaco, tecidos adiposos
GLUT-5	6-11**	Frutose	Intestino
Simporte acoplado a Na^+ (transporte ativo)			
SGLT-1	0,35	Glicose ($2Na^+$/1 glicose), galactose	Intestino, rins
SGLT-2	1,6	Glicose ($1Na^+$/1 glicose)	Rins

Valores de K_m são determinados a partir da entrada de 2-deoxi-d-glicose (*), um análogo não metabolizável da glicose e frutose (**).

Transporte por canais e poros

Os canais ou poros de membrana são condutores abertos e menos seletivos para o transporte de íons, metabólitos e até proteínas através das biomembranas

Os canais frequentemente são descritos como túneis através da membrana, nos quais os locais de ligação para os substratos (íons) são acessíveis de qualquer um dos lados da membrana ao mesmo tempo (Fig. 8.1B). Mudanças conformacionais não são necessárias para a translocação dos substratos entrando por um lado da membrana para sair pelo outro lado. Entretanto, alterações na voltagem e na ligação do ligante induzem mudanças conformacionais na estrutura do canal com o efeito de abertura ou fechamento dos canais – processos conhecidos como **dependentes de voltagem ou de ligante** *(gating)*. O movimento de moléculas através dos canais é rápido em comparação com as taxas alcançadas pelos transportadores (Tabela 8.1).



Quadro clínico

Transporte defeituoso de glicose através da barreira hematoencefálica como causa de convulsões e desenvolvimento retardado

Uma criança do sexo masculino de 3 meses sofreu convulsões recorrentes. As concentrações de glicose no líquido cefalorraquidiano (LCR) estavam baixas (0,9-1,9 mmol/L, 16-34 mg/dL) e a proporção de glicose do LCR para o sangue variava de 0,19 a 0,33, sendo que o valor normal é de 0,65.

As causas potenciais das baixas concentrações de glicose no LCR, tais como meningite bacteriana, hemorragia subaracnoide e hipoglicemia, não estavam presentes, e altos valores de lactato no LCR podiam ser encontrados em todas essas condições, exceto na hipoglicemia. Em contraste, as concentrações de lactato no LCR foram consistentemente baixas (0,3-0,4 mmol/L; 3-4 mg/dL) quando comparadas com o valor normal (<2,2 mmol/L; <20mg/dL). Esses achados sugerem um defeito no transporte de glicose do sangue para o cérebro.

Comentário

Assumindo que a atividade do transportador de glicose GLUT-1 nos eritrócitos reflete aquela nos microvasos do cérebro, um ensaio de transporte foi realizado usando seus eritrócitos. O $T_{máx}$ para a entrada de glicose nos eritrócitos do paciente foi 60% do valor normal médio, sugerindo defeito heterozigoto. Uma dieta cetogênica (dieta rica em gordura, pobre em proteína e carboidratos) foi iniciada, visto que o cérebro pode usar os corpos cetônicos como fonte de combustível oxidável, e a entrada de corpos cetônicos para dentro do cérebro não depende do sistema de transporte de glicose. O paciente parou de ter convulsões dentro de quatro dias após o início da dieta.

Eventualmente, os termos “canais” e “poros” são usados de maneira alternada.

Contudo, "poro" é usado mais frequentemente para descrever estruturas mais abertas, estruturas não seletivas que discriminam entre substratos; p. ex., peptídios ou proteínas, com base no tamanho. O termo "canal" é geralmente aplicado para canais iônicos mais específicos.

Três exemplos de poros importantes para a fisiologia celular

A **junção comunicante** *(gap)* entre as células endoteliais, musculares e neuronais é um grupo de pequenos poros, nos quais dois cilindros de seis subunidades de **conexinas** na membrana plasmática se juntam uns aos outros para formar um poro de aproximadamente 1,2-2,0 nm (12-20 Å) de diâmetro. Moléculas menores que cerca de 1 kDa podem passar entre as células através dessas junções comunicantes. Tal intercâmbio célula-célula é importante para a comunicação ou acoplamento fisiológico; por exemplo, na contração combinada do músculo uterino durante o trabalho de parto. Mutações nos genes que codificam para a conexina 26 e conexina 32 causam surdez e doença de Charcot-Marie-Tooth, respectivamente.

Os **poros nucleares** têm raio de aproximadamente 9,0 nm (90 Å) através do qual grandes proteínas e ácidos nucleicos entram e saem do núcleo.

Uma terceira classe de poros é importante para o direcionamento de proteínas. Proteínas mitocondriais codificadas por genes nucleares são transportadas para essa organela através de poros na membrana mitocondrial externa. Cadeias de polipeptídios nascentes de proteínas secretórias e proteínas da membrana plasmática também passam pelos poros da membrana do retículo endoplasmático durante a biossíntese da cadeia peptídica.

Transporte ativo

Os sistemas de transporte ativo primário usam ATP diretamente para dirigir o transporte; o transporte ativo secundário usa um gradiente eletroquímico de íons Na^+ ou H^+, ou um potencial de membrana produzido por processos de transporte ativo primário

O ATP é um produto do metabolismo de alta energia e frequentemente é descrito como "energia utilizável" da célula (Cap. 9). A ligação fosfoanidrido do ATP libera energia livre quando é hidrolisada para produzir difosfato de adenosina (ADP) e fosfato inorgânico. Tal energia é usada para a biossíntese, movimento celular e transporte ascendente de moléculas contra gradientes de concentração. Os sistemas primários de transporte ativo usam ATP diretamente para dirigir o transporte; o transporte ativo secundário usa um gradiente eletroquímico de íons Na^+ ou H^+, ou um potencial de membrana produzido pelos processos de transporte ativo primários. Em geral, açúcares e aminoácidos são transportados para dentro das células por sistemas secundários de transporte ativo.

Os sistemas de transporte ativo primário usam ATP para dirigir bombas iônicas (ATPases transportadoras de íons ou bombas ATPases)

As bombas ATPases são classificadas em quatro grupos (Tabela 8.3). As ATPases de fatores de acoplamento (F-ATPases) na mitocôndria, cloroplasto e membranas bacterianas hidrolisam o ATP e transportam íons hidrogênio (H^+). Como discutido em detalhe no próximo capítulo, a **F-ATPase** mitocondrial trabalha em direção inversa, sintetizando ATP a partir do ADP e fosfato, à medida que os prótons se movem a favor de um gradiente eletroquímico (concentração e carga) produzido através da membrana interna da mitocôndria durante o metabolismo oxidativo. O produto (ATP) é liberado dentro da matrix mitocondrial, mas é necessário para as reações biossintéticas no citoplasma. O ATP é transportado para o citoplasma através de uma **translocase ATP-ADP** na membrana interna mitocondrial. Essa translocase é um exemplo de sistema **antiporte** (Fig. 8.1C); ela torna possível que uma molécula de ADP entre somente se uma molécula de ATP sair simultaneamente.

Tabela 8.3

Transportadores ativos primários em células eucarióticas

Grupo	Membro	Localização	Substrato(s)	Funções
F-ATPase (fator de acoplamento)	H^+-ATPase	Membrana interna da mitocôndria	H^+	Síntese de ATP dirigida por gradiente eletroquímico de H^+
V-ATPase (vacuolar)	H^+-ATPase	Vesículas citoplasmáticas (lisozima, granulossecretórios), membranas plasmáticas (borda enrugada dos osteoclastos, célula epitelial renal)	H^+	Ativação das enzimas lisossomais, acúmulo de neurotransmissores, reciclagem óssea, acidificação da urina
P-ATPase (fosforilação)	Na^+/K^+-ATPase	Membranas plasmáticas (ubíquo, mas abundante nos rins e coração)	Na^+ e K^+	Geração de gradiente eletroquímico de Na^+ e K^+
	H^+/K^+-ATPase	Estômago (célula parietal na glândula gástrica)	H^+ e K^+	Acidificação do lúmen do estômago
	Ca^{2+}-ATPase	Retículo sarcoplasmático e retículo endoplasmático	Ca^{2+}	Sequestro de Ca^{2+} para dentro do retículo sarcoplasmático (endoplasmático)
	Ca^{2+}-ATPase	Membrana plasmática	Ca^{2+}	Excreção de Ca^{2+} para fora da célula
	Cu^{2+}-ATPase	Membrana plasmática e vesículas citoplasmáticas	Cu^{2+}	Absorção de Cu^{2+} do intestino e excreção do fígado
Transportador ABC (região de ligação do ATP)	Glicoproteína P	Membrana plasmática	Vários fármacos	Excreção de substâncias nocivas, resistência a multifármacos antineoplásicos
	MRP	Membrana plasmática	Glutationa conjugada	Detoxificação, resistência a multifármacos
	CFTR*	Membrana plasmática	Cl^-	Canal de cloreto dependente de cAMP regulação de outros canais
	TAP	Retículo endoplasmático	Peptídio	Apresentação de peptídios para a resposta imune

Vários exemplos de transportadores ativos primários (bombas ATPases dirigidas por ATP) são listados junto às suas localizações.

*Alguns transportadores ABC funcionam como canais ou reguladores de canais. MRP, proteína associada à resistência a multifármacos; CFTR, regulador de condutância transmembrana da fibrose cística; TAP, transportador associado a processamento de antígeno.

As vesículas citoplasmáticas, tais como lisossomos, endossomos e grânulos secretores, são acidificadas por uma **H^+-ATP- ase tipo V (vacuolar)** em suas membranas. A acidificação por essa V-ATPase é importante para a atividade das enzimas lisossomais que têm pH ácido ótimo e para o acúmulo de fármacos e neurotransmissores nos grânulos secretores. A V-ATPase também acidifica o meio ambiente extracelular dos

osteoclastos e células epiteliais renais. Defeitos na V-ATPase da membrana plasmática dos osteoclastos resultam em osteopetrose (aumento na densidade óssea), enquanto mutação na ATPase nos ductos coletores renais causa acidose tubular renal. As ATPases dos tipos F e V são estruturalmente similares e parecem ser derivadas de um ancestral comum. A subunidade catalítica ligante de ATP e a subunidade formadora da via H^+ são conservadas entre essas ATPases.

As **P-ATPases** formam intermediários fosforilados que direcionam a translocação dos íons: o "P" se refere à fosforilação. Esses transportadores têm um local ativo no resíduo de aspartato que é reversivelmente fosforilado pelo ATP durante o processo de transporte. A Na^+/K^+-ATPase do tipo P em vários tecidos e a Ca^{2+}- ATPases no retículo sarcoplasmático têm importantes papéis na manutenção dos gradientes iônicos celulares. As Na^+/K^+- ATPases também criam um **gradiente eletroquímico** de Na^+ que produz a força responsável pela absorção de nutrientes pelo intestino (ver adiante). A descarga desse gradiente eletroquímico também é fundamental para o processo de transmissão nervosa. Mutações nos genes da P-ATPase causam a cardiomiopatia de Brody (Ca^{2+}-ATPase), enxaqueca hemiplégica familiar do tipo 2 (Na^+/K^+-ATPase) e as doenças de Menkes e Wilson (Cu^{2+}-ATPases).

Os **transportadores que ligam ATP (ABC)** compreendem a quarta família de transportadores ativos. "ABC" é a abreviação para "ATP-*binding cassette*", que se refere a uma região de ligação ao ATP no transportador (Tabela 8.3). A glicoproteína P ("P" = permeabilidade) e **MRP (proteína associada à resistência a multifármacos)**, as quais apresentam papel fisiológico na excreção de metabólitos tóxicos e xenobióticos, contribuem para a resistência de células tumorais à quimioterapia. Os transportadores TAP, uma classe de transportadores ABC associados à apresentação de antígeno, são necessários para a iniciação da resposta imune contra proteínas estranhas; eles medeiam o transporte do peptídio antigênico do citosol para o retículo endoplasmático. Alguns transportadores ABC estão presentes nas membranas dos peroxissomos em que parecem estar envolvidos no transporte de enzimas dessas organelas necessárias para a oxidação de ácidos graxos de cadeia muito longa. Defeitos nos transportadores ABC estão associados a várias doenças (ver quadro na página seguinte).

Uniporte, simporte e antiporte são exemplos de transporte ativo secundário

Os processos de transporte podem ser classificados em três tipos gerais: uniporte (monoporte), simporte (cotransporte) e antiporte (contratransporte) (Fig. 8.1). O transporte de substratos se move na mesma direção durante o simporte e em direções opostas durante o antiporte. O uniporte de substratos carregados pode ser eletroforeticamente direcionado pelo potencial de membrana da célula. O movimento de um substrato contra seu gradiente de concentração pode ser dirigido pelo antiporte de outro substrato (normalmente um cátion, como Na^+ ou H^+) a favor do gradiente. As proteínas participantes desses sistemas de transporte são denominadas uniportes, simportes e antiportes, respectivamente (Tabela 8.1). Alguns exemplos são apresentados adiante.

No caso dos íons Na^+, a diferença de concentração entre o lado externo (145 mmol/L) e

o interno (12 mmol/L) da célula é um fator de cerca de 10, sendo mantido pela Na^+/K^+-ATPase. A **Na^+/K^+-ATPase** é eletrogênica, bombeando para fora três íons Na^+ e para dentro dois íons K^+, gerando um potencial de membrana negativo no lado interno. O K^+ vai para o lado externo através dos canais de K^+, a favor do gradiente de concentração (140 mmol/L para 5 mmol/L), promovendo o aumento no potencial elétrico. O gradiente de concentração dos íons Na^+ e o potencial elétrico (negativo dentro) forçam a importação e a exportação de outras moléculas com Na^+ contra seu gradiente de concentração por simportes e antiportes, respectivamente.

Exemplos de sistemas de transporte e seu acoplamento

Transporte e mobilização de Ca^{2+} no músculo

A despolarização da membrana abre canais iônicos dependentes de voltagem na junção neuromuscular

O músculo estriado (esquelético e cardíaco) é composto por feixes de células musculares (Cap. 20). Cada célula é embalada com feixes de filamentos actina e miosina (miofibrilas) que produzem a contração. Durante a contração muscular, os nervos da junção neuromuscular estimulam a despolarização local da membrana pela abertura dos canais de Na^+ dependentes de voltagem. A despolarização se espalha rapidamente para dentro das invaginações da membrana plasmática, chamadas de túbulos transversos (T), as quais se estendem em torno das miofibrilas (Fig. 20.5).



Quadro clínico

Doenças de menkes e wilson

A **doença de Menkes** ligada ao X é um distúrbio letal que ocorre em 1 a cada 100.000 crianças nascidas e é caracterizada por cabelo anormal e hipopigmentado, face característica, degeneração cerebral, defeitos nos tecidos conectivo e vascular, e morte em torno dos 3 anos de idade. Uma P-ATPase transportadora de cobre que é expressa em todos os tecidos, exceto no fígado, é defeituosa nessa doença (Tabela 8.3). Em pacientes com a doença de Menkes, o cobre entra nas células intestinais, mas não é transportado posteriormente, resultando em grave deficiência de cobre. A administração subcutânea de um complexo de cobre e histidina pode ser um tratamento efetivo se iniciado precocemente.

O gene para a **doença de Wilson** também codifica uma P-ATPase transportadora de cobre e é 60% idêntico ao gene de Menkes. Ele é expresso no fígado, rins e placenta. A doença de Wilson ocorre em 1 a cada 35.000-100.000 recém-nascidos e é caracterizada por falha em incorporar cobre na ceruloplasmina do fígado e falha em excretar cobre do fígado para a bile, resultando em acúmulo tóxico de cobre no fígado e também nos rins, cérebro e córnea. Cirrose hepática, dano neurológico progressivo ou ambos

ocorrem durante a infância até a adolescência. Os agentes quelantes tais como penicilamina são usados para o tratamento dos pacientes com essa doença. O tratamento com zinco oral pode ser útil para a redução da absorção do cobre da dieta. O cobre é um metal essencial e um componente integral de muitas enzimas. Entretanto, ele é tóxico em excesso porque se liga a proteínas e ácidos nucleicos, aumenta a geração de radicais livres e catalisa a oxidação de lipídios e proteínas nas membranas.



Quadro de conceitos avançados

Doença dos transportadores abc

Os dados do genoma humano sugerem que existem cerca de 50 genes para os transportadores ABC. Uma ampla e incomum variedade de doenças é causada por defeitos nos transportadores ABC, incluindo doença de Tangier, doença de Stargardt, colestase intra-hepática progressiva, síndrome de Dubin-Johnson, pseudoxantoma elástico, hipoglicemia hiperinsulínica persistente familiar da infância (PHHI), adrenoleucodistrofia, síndrome de Zellweger, sitosterolemia e fibrose cística.

A **fibrose cística (FC)** é a doença autossômica recessiva mais comum e potencialmente letal nas populações caucasianas, afetando um a cada 2.500 recém-nascidos. A FC é comumente manifestada como insuficiência pancreática exócrina, aumento na concentração de íons cloreto (Cl^-) no suor, infertilidade masculina e doença das vias aéreas, que é a principal causa de morbidade e mortalidade. As patologias pancreática e pulmonar resultam a partir da viscosidade aumentada dos fluidos secretados (mucoviscosidose). A FCF é causada por mutações no gene CFTR (regulador da condutância transmembrana na fibrose cística), o qual codifica o canal de Cl^-. A ligação de ATP ao CFTR é necessária para a abertura do canal. A falta da atividade desse canal no epitélio de pacientes com FC afeta tanto a secreção de íons quanto de água.



Quadro de conceitos avançados

Gradientes eletroquímicos

A permeabilidade da maioria dos não eletrólitos através das membranas pode ser analisada assumindo-se que o passo limitante é a difusão dentro da bicamada lipídica. Sua permeabilidade através da bicamada fosfolipídica é experimentalmente mostrada como uma função do coeficiente de partição entre os solventes aquosos e orgânicos. A taxa relativa de difusão simples de uma molécula através da membrana é, portanto, proporcional ao seu gradiente de concentração através da bicamada e à hidrofobicidade da molécula.

Para moléculas carregadas e íons, o transporte através da membrana deve ser facilitado por um transportador ou canal e é dirigido pelo gradiente eletroquímico,

uma combinação do gradiente de concentração (potencial químico) e o gradiente de voltagem através da membrana (potencial elétrico). Essas forças podem agir na mesma direção ou em direções opostas.

Os **canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes (CCVD)** localizados nos túbulos T dos músculos esqueléticos mudam sua conformação em resposta à despolarização da membrana e ativam diretamente um canal liberador de Ca^{2+} na membrana do retículo sarcoplasmático, uma rede de túbulos achatados que circundam cada miofibrila no citoplasma da célula muscular. O escape de Ca^{2+} do lúmen (compartimento interior) do retículo sarcoplasmático aumenta as concentrações de Ca^{2+} citoplasmático (despolarização induzida por liberação de Ca^{2+}) em cerca de 100 vezes, de 10^{-4} mmol/L (0,0007 mg/L) para cerca de 10^{-2} mmol/L (0,07 mg/dL), disparando a hidrólise de ATP pela miosina, a qual inicia a contração muscular. Posteriormente, uma Ca^{2+}-ATPase no retículo sarcoplasmático hidrolisa o ATP para transportar o Ca^{2+} de volta do citoplasma para dentro do lúmen do retículo sarcoplasmático, diminuindo o Ca^{2+} citoplasmático possibilitando o relaxamento muscular (Fig. 8.4, esquerda).

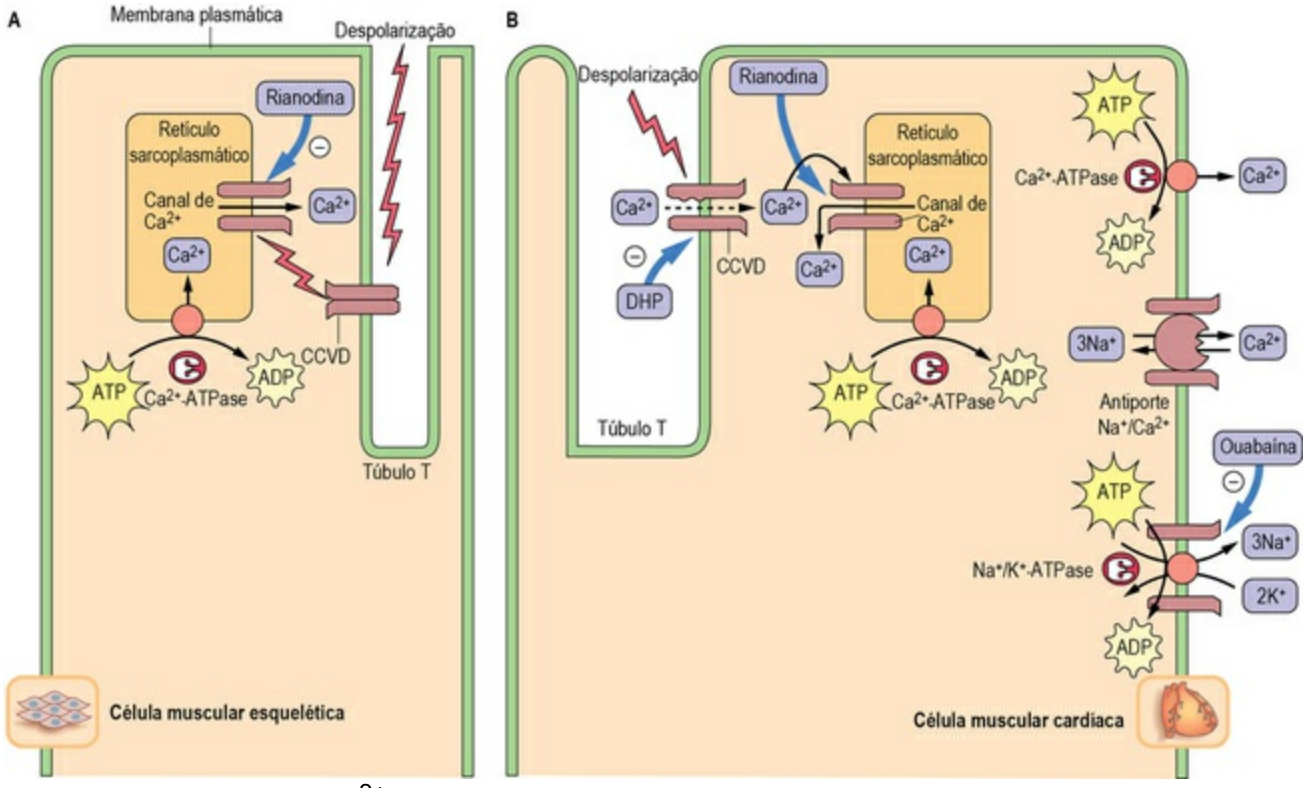


FIG. 8.4 Movimento de Ca^{2+} no ciclo de contração muscular.
Papel dos transportadores no movimento de Ca^{2+} nas células musculares esquelética **(A)** e cardíaca **(B)** durante a contração. As setas grossas indicam os locais de ligação para os inibidores. No **músculo esquelético**, os CCVD ativam diretamente a liberação de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático. O aumento da concentração de Ca^{2+} citoplasmático dispara a contração muscular. A Ca^{2+}-ATPase do retículo sarcoplasmático bombeia Ca^{2+} de volta para o lúmen, diminuindo a concentração citoplasmática de Ca^{2+} e o músculo relaxa. No **músculo cardíaco,** CCVD permitem a entrada de pequenas quantidades de Ca^{2+} que induzem a liberação de Ca^{2+} do lúmen do retículo sarcoplasmático. Dois tipos de antiporte de Ca^{2+}-ATPase e um Na^+/Ca^{2+}-ATPase são responsáveis pelo bombeamento de Ca^{2+} citoplasmático para fora da célula muscular. O antiporte Na^+/Ca^{2+} utiliza o gradiente de sódio (Na^+) produzido pela Na^+/K^+-ATPase para antiporte de Ca^{2+}. DHP, di-hidropiridina, nifedipina, um bloqueador de canal de cálcio usado para o tratamento da hipertensão. A rianodina é um potente inibidor do canal de Ca^{++} no retículo sarcoplasmático.

No músculo cardíaco, os CCVD permitem a entrada de pequenas quantidades de Ca^{2+}, que então estimula a liberação de Ca^{2+} através do canal de Ca^{2+} do lúmen do retículo sarcoplasmático (liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+}). Além de Ca^{2+}-ATPase do retículo sarcoplasmático, um antiporte Na^+/Ca^{2+} e uma Ca^{2+}-ATPase de membrana plasmática também são responsáveis pelo bombeamento do Ca^{2+} citoplasmático para o lado externo do músculo cardíaco (Fig. 8.4, direita). A rápida restauração dos gradientes iônicos possibilitam as contrações rítmicas do coração.

Transporte ativo de glicose nos intestinos

Uma Na^+/K^+-ATPase dirige a captação de glicose pelas células epiteliais intestinais e renais

O transporte de glicose sanguínea para dentro das células geralmente ocorre por difusão facilitada, visto que a concentração intracelular de glicose é geralmente menor que a do

sangue (Tabela 8.2). Em contraste, o transporte de glicose do intestino para o sangue envolve os processos de difusão facilitada e o transporte ativo (Fig. 8.5). O transporte ativo é especialmente importante para a recuperação máxima de açúcares do intestino quando a concentração intestinal de glicose cai abaixo da do sangue.

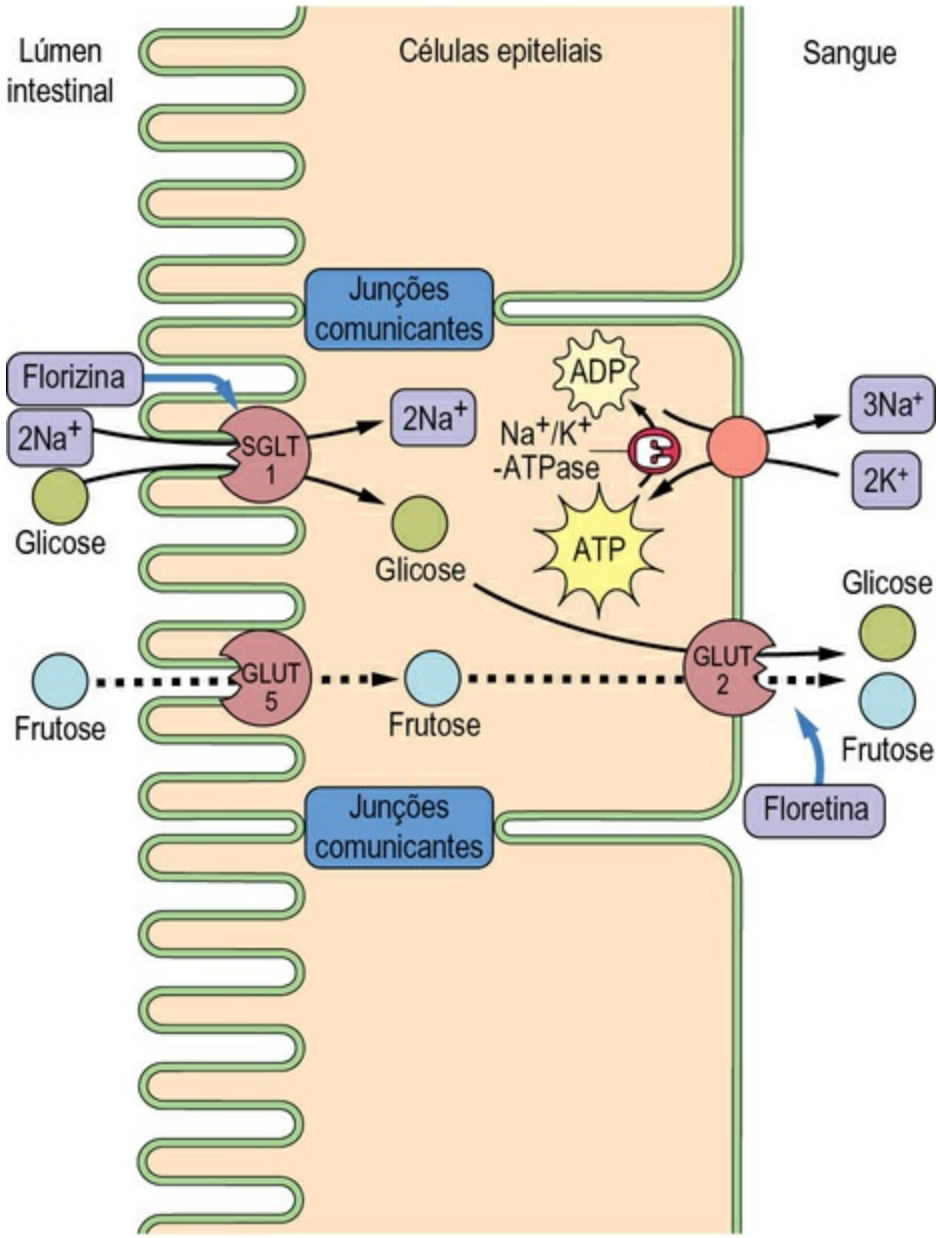


FIG. 8.5 Transporte de glicose do lúmen intestinal para o sangue.
A glicose é bombeada para a célula através de um simporte de glicose acoplado a Na^+ (SGLT1), e passa para o lado externo da célula por difusão facilitada mediada pelo uniporte GLUT-2. O gradiente de Na^+ para o simporte de glicose é mantido pela Na^+/K^+-ATPase, que mantém baixa a concentração intracelular de Na^+. O SGLT1 é inibido pela florizina e o GLUT-2 pela floretina. O GLUT-5 insensível à floretina catalisa a absorção de frutose por difusão facilitada. A frutose é então exportada através do GLUT-2. Um defeito na SGLT1 causa má absorção de glicose/galactose. Células adjacentes estão conectadas pelas junções comunicantes impermeáveis, as quais evitam que os solutos cruzem o epitélio.

Um simporte SGLT1 de glicose acoplado ao Na^+ é direcionado pelo gradiente de Na^+ formado pela Na^+/K^+-ATPase, que transporta glicose para dentro da célula epitelial intestinal, enquanto o **GLUT-2** facilita o deslocamento da glicose para a circulação porta

(Fig. 8.5). Uma via similar opera nos rins.

O glomérulo renal é um sistema de ultrafiltração que filtra pequenas moléculas do sangue. No entanto, glicose, aminoácidos, muitos íons e outros nutrientes no ultrafiltrado são quase completamente reabsorvidos nos túbulos proximais por processos simporte. A glicose é reabsorvida primariamente **pelo transportador 2 de sódio glicose** (**SGLT2**; estequiometria de um para um para Na^+:Glc) para as células epiteliais do túbulo proximal renal. Quantidades muito menores de glicose são recuperadas pelo **SGLT1** em um segmento posterior do túbulo, o qual acopla o transporte de uma molécula de glicose com dois íons sódio. A concentração de Na^+ no filtrado é de 140 mmol/L (322 mg/dL), enquanto dentro das células epiteliais é de 30 mmol/L (69 mg/dL), de modo que o Na^+ flui "ladeira abaixo", juntamente com seu gradiente, arrastando a glicose "para cima" contra seu gradiente de concentração. Assim como nas células epiteliais, a baixa concentração intracelular de Na^+ é mantida por uma Na^+/K^+-ATPase no lado oposto da célula epitelial tubular, a qual antiporta três íons sódio citoplasmáticos para dois íons potássio extracelulares, acoplados com a hidrólise de uma molécula de ATP.

Quadro de conceitos avançados

Vários fármacos inibem os transportadores no músculo

Fenilalquilamina (verapamil), benzodiazepina (diltiazem) e di-hidropiridina (DHP, nifedipina) são **bloqueadores de canais de Ca^{2+}** que inibem os CCVDs (Fig. 8.4). A rianodina inibe o canal liberador de Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático. Esses fármacos são usados como **agentes anti-hipertensivos** para inibir o aumento da concentração citoplasmática de Ca^{2+} e, assim, a força da contração muscular. Em contraste, os glicosídios cardíacos, como a ouabaína e a digoxina, aumentam a contração do músculo cardíaco e são usadas para o tratamento da falência cardíaca congestiva. Eles agem pela inibição da Na^+/K^+-ATPase, que gera o gradiente de concentração de Na^+ usado para direcionar a exportação de Ca^{2+} pelo antiporte Na^+/Ca^{2+}. Venenos de cobra, tais como a α-bungarotoxina e a tetrodotoxina do peixe Puffer, inibem os canais de Na^+ voltagem-dependentes. A lidocaína, um bloqueador de canais de Na^+, é usada como um fármaco anestésico local e antiarrítmico. A inibição dos canais de Na^+ reprime a transmissão do sinal de despolarização.

Quadro clínico

Modulação da atividade transportadora no diabetes

O canal de K^+ sensível à ATP (K_{ATP}) participa da regulação da secreção de insulina nas células β da ilhota pancreática. Quando a concentração sanguínea de glicose aumenta, esta é transportada para dentro das células β através do transportador de glicose (GLUT-2) e metabolizada, resultando em aumento na concentração citoplasmática de

ATP. O ATP se liga à subunidade regulatória do canal de K^+, K_{ATP}-β (chamado de receptor sulfonilureia, SUR1), causando mudança estrutural da subunidade K_{ATP}-α, a qual fecha o canal de K_{ATP}. Isso induz despolarização da membrana plasmática (reduz o gradiente de voltagem através da membrana) e ativa os canais de cálcio voltagem-dependentes (CCVD). A entrada de cálcio estimula a exocitose das vesículas que contêm insulina.

A ligação da sulfonilureias, como tolubutamida e glibenclamida, ao K_{ATP}-β no lado externo da membrana plasmática mimetiza o efeito regulatório do ATP intracelular. As sulfonilureias estimulam a secreção de insulina, a qual reduz a concentração sanguínea de glicose no diabetes.

Os canais de K_{ATP} defeituosos, os quais são incapazes de transportar K^+, induzem baixas concentrações sanguíneas de glicose, uma condição chamada de hiperglicemia hiperinsulinêmica persistente da criança (PHHI), que ocorre em uma a cada 50.000 pessoas, como resultado da perda da função do canal de K^+ e contínua secreção de insulina.

Acidificação do suco gástrico por uma bomba de próton no estômago

Uma P-ATPase nas células parietais gástricas mantém o baixo pH do estômago

O lúmen do estômago é altamente ácido (pH ≈1) devido à existência de uma bomba de prótons (**H^+/K^+-ATPase;** P-ATPase na Tabela 8.3) que é especificamente expressa nas células gástricas parietais. No estado de repouso, a bomba de próton gástrica está localizada nas vesículas intracelulares. Estímulos como histamina e gastrina induzem a fusão das vesículas com a membrana plasmática (Fig. 8.6A). A bomba antiporta dois prótons citoplasmáticos e dois íons potássio extracelulares, acoplados com hidrólise de uma molécula de ATP; assim, isso é chamado de H^+/K^+-ATPase. O contraíon Cl^- é secretado por um canal de Cl^-, produzindo o ácido clorídrico (HCl) (ácido gástrico) no lúmen (Fig. 8.6B).

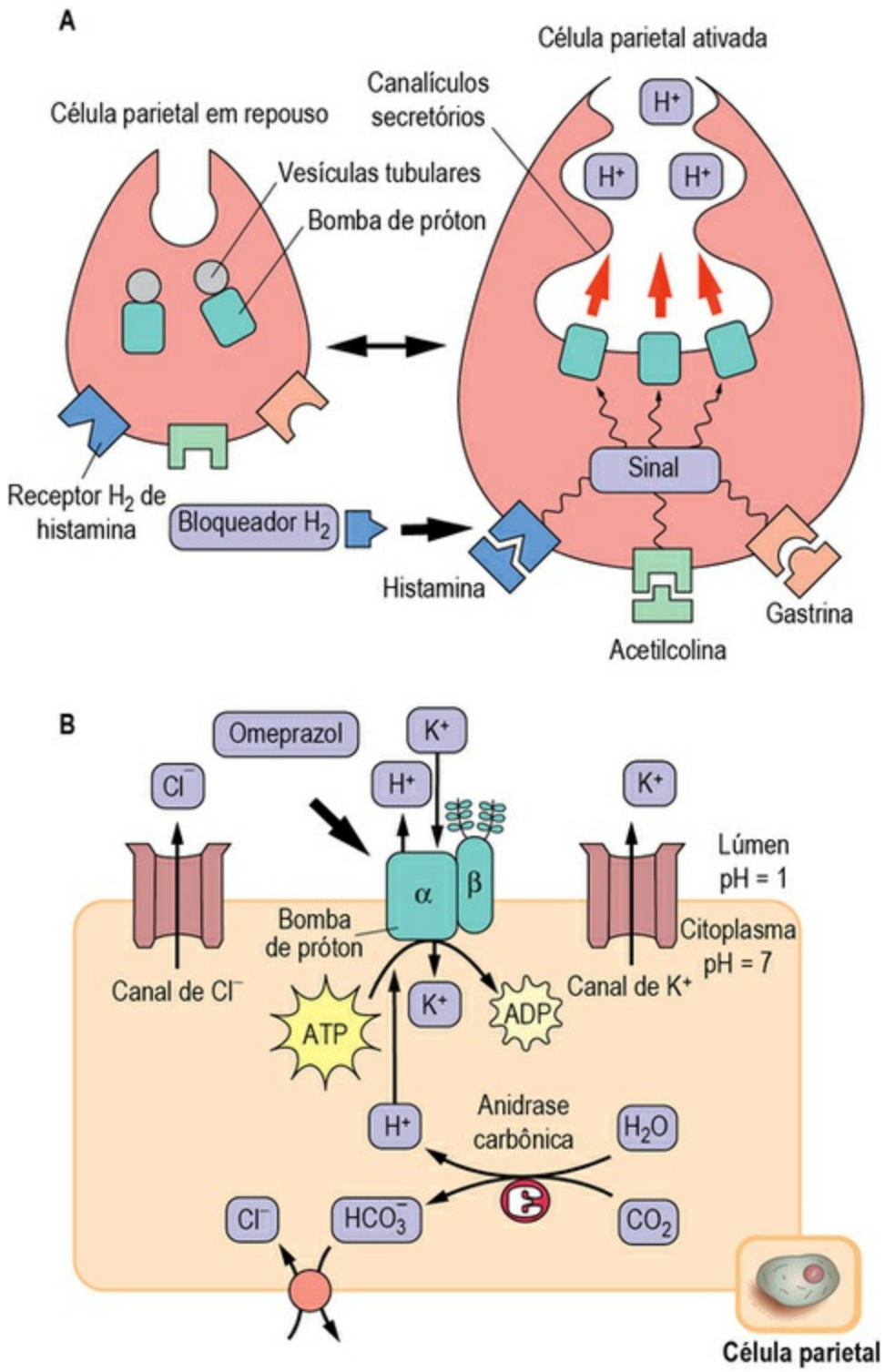


FIG. 8.6 Secreção ácida pelas células parietais gástricas.
(A) A secreção ácida é estimulada pelos sinais extracelulares e acompanhada por mudanças morfológicas nas células parietais, do repouso (esquerda) para o estado ativado (direita). A bomba de prótons (H^+/K^+-ATPase) se move para o canalículo secretório (membrana plasmática) das vesículas tubulares citoplasmáticas. Os bloqueadores H_2 competem com a histamina nos receptores H_2 de histamina. **(B)** Balanço iônico na célula parietal. Os H^+ transportados pela bomba de prótons são fornecidos pela anidrase carbônica. Bicarbonato, o outro produto dessa enzima, é transportado em troca do Cl^-, o qual é secretado através do canal de Cl^-. Os íons potássio importados pela bomba de prótons são novamente excretados pelo canal de K^+. A bomba de prótons tem uma unidade catalítica α e β-glicosilada. O fármaco omeprazol modifica covalentemente os resíduos de cisteína localizados no domínio extracitoplasmático da subunidade α e inibe a bomba de prótons. As setas cheias indicam os locais de ligação para os inibidores.

O transporte renal de Na^+ e o sistema renina-angiotensina-aldosterona

O rim é o principal local de regulação da homeostasia do Na^+; vários sistemas de transporte participam no processamento do Na^+ nos túbulos renais

O rim desempenha papéis importantes na preservação da homeostasia da água e dos eletrólitos (Cap. 23). A urina primária é formada por filtração glomerular. Os sais que passam através do filtro glomerular são reabsorvidos no túbulo renal. Grande parte da reabsorção de Na^+ nos túbulos ocorre nos segmentos proximais. Embora < 10% da reabsorção de Na^+ ocorra no nefrônio distal, esse local é reconhecido por ser essencial à regulação do volume plasmático, visto que a reabsorção de Na^+ no nefrônio distal é sensível ao hormônio esteroide aldosterona.

Como indicado na Figura 8.7, várias proteínas transportadoras de Na^+ participam na reabsorção de Na^+ nos túbulos renais. Dentre estas, a Na^+/K^+-ATPase expressa nas membranas basolaterais das células epiteliais transporta Na^+ através da membrana para o sangue, e gera uma baixa concentração intracelular de Na^+. Os íons Na^+ na urina são transportados para as células epiteliais através das membranas apicais por proteínas transportadoras de Na^+ segmento-específicas. O sistema de antiporte Na^+/H^+ (NHE3) medeia a entrada de Na^+ no túbulo proximal. O sistema de simporte Na^+/K^+-$2Cl^-$ (NKCC2), sensível à furosemida, e o cotransportador Na^+/Cl^- (NCCT), sensível à tiazida, estão localizados na porção espessa ascendente da alça de Henle e nos túbulos contorcidos distais, respectivamente. O canal de Na^+ epitelial (ENaC) sensível à amilorida é expresso no nefrônio distal sensível à aldosterona. O balanço iônico das células epiteliais é também regulado pelo canal de K^+ da medula externa renal (ROMK) e pelo canal de Cl^- (ClC).

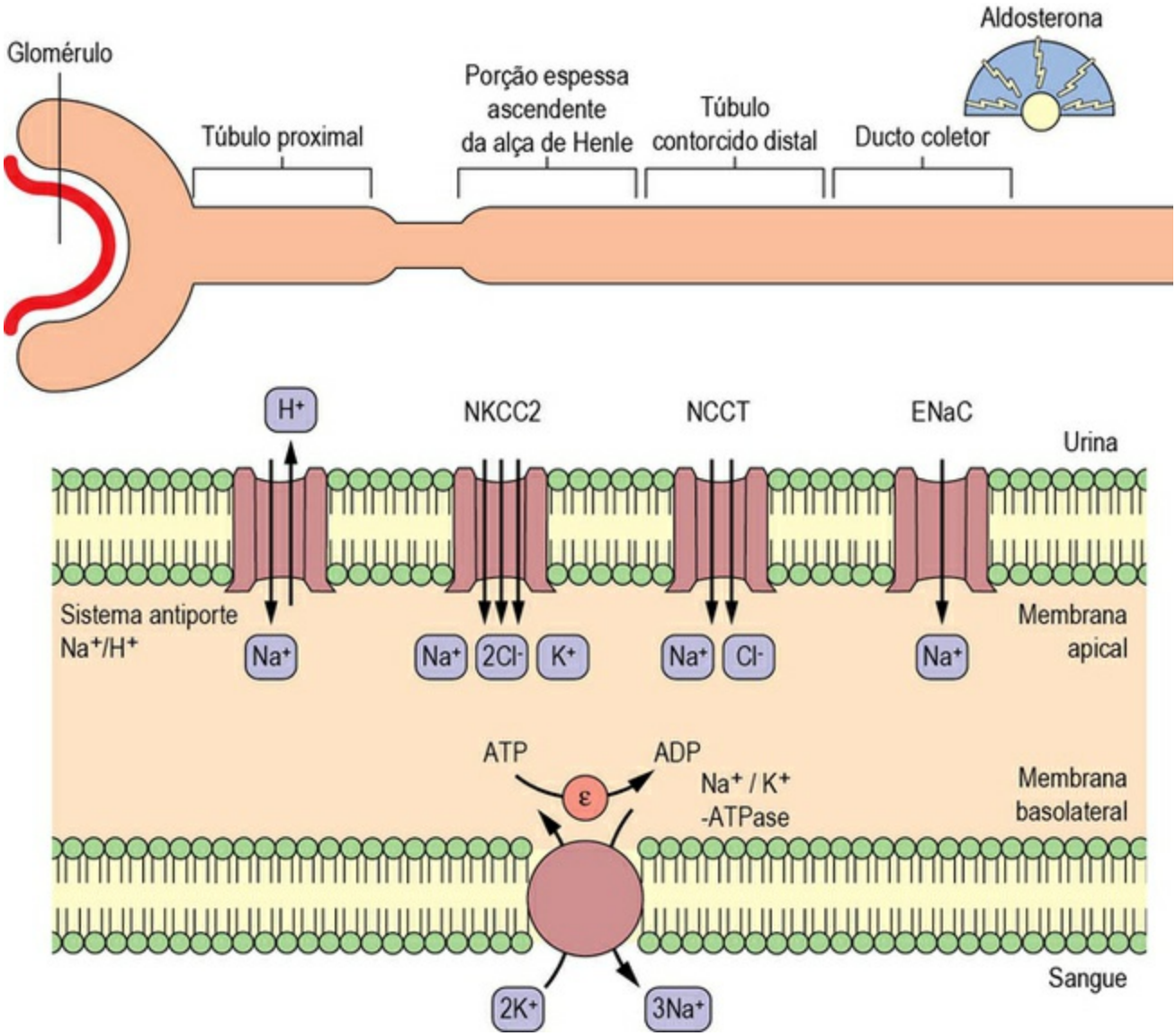


FIG. 8.7 Expressão segmento-específica de proteínas renais transportadoras de Na^+.
Várias proteínas transportadoras de Na^+ expressas nas membranas apicais das células epiteliais renais transportam Na^+ da urina para as células. Nas células, o Na^+ é excretado para o sangue por uma Na^+/K^+-ATPase expressa nas membranas basolaterais. Os íons K^+ são reciclados através do ROMK basolateral na porção espessa ascendente da alça de Henle e no nefrônio distal sensível à aldosterona. Os íons cloreto deixam as células na porção espessa ascendente da alça de Henle e no túbulo contorcido distal através de CIC.

Quadro clínico

Inibindo a bomba de prótons gástrica e erradicação do *helicobacter pylori*

Uma forte secreção ácida crônica pela bomba de prótom gástrica lesiona o estômago e o duodeno, levando a úlceras gástricas e duodenais. Os inibidores das bombas de prótons, como o omeprazol, são distribuídos para as células parietais a partir da circulação após administração oral. O omeprazol é um pró-fármaco; ele se acumula no compartimento ácido, visto que é uma base fraca, e é convertido ao composto ativo sob as condições ácidas no lúmen gástrico. A forma ativa modifica covalentemente resíduos de cisteína localizados no domínio extracitoplasmático da bomba de próton.

Os bloqueadores H_2 (antagonistas do receptor) como cimetidina e ranitidina inibem indiretamente a secreção ácida pela competição com a histamina pelos seus receptores (Fig. 8.6).

Comentário

A infecção do estômago por *Helicobacter pylori* também causa úlceras e está associada a risco aumentado de adenocarcinoma gástrico. Recentemente, o tratamento com antibiótico foi introduzido para erradicar o *H. pylori*. É interessante notar que ele se torna muito mais efetivo quando ministrado junto a omeprazol, possivelmente devido a uma estabilidade aumentada do antibiótico na condição pouco ácida produzida pela inibição da bomba de próton.

O sistema renina-angiotensina-aldosterona desempenha um papel central na regulação do volume circulante, da osmolalidade dos fluidos extracelulares e da pressão sanguínea

Como discutido em mais detalhe nos Capítulos 24 e 25, a renina é produzida no aparelho justaglomerular do rim mediante diminuição do volume circulante, e converte o angiotensinogênio produzido no fígado em angiotensina I. A angiotensina I é convertida em angiotensina II pela enzima conversora de angiotensina (ECA). A angiotensina II produzida no sangue promove a liberação de aldosterona das glândulas adrenais. A aldosterona promove a retenção renal de Na^+ e de água e uma elevada pressão sanguínea, por aumentar a reabsorção de Na^+ no ducto coletor cortical. A angiotensina II promove igualmente elevações na pressão sanguínea por vasoconstrição direta e por aumentar a reabsorção de Na^+ no túbulo proximal.

Resumo

- A maioria das propriedades de permeabilidade da membrana é determinada pelas proteínas de transporte, as quais são proteínas integrais de membrana.
- O transporte mediado por proteína é um processo saturável com alta especificidade pelo substrato.
- A difusão facilitada é catalisada por transportadores que possibilitam o movimento de íons e moléculas a favor de gradiente de concentração, enquanto o transporte ativo necessita de energia.
- O transporte ativo primário é catalisado pelas bombas ATPases que usam energia produzida pela hidrólise do ATP.
- O transporte ativo secundário usa os gradientes eletroquímicos de Na^+ e H^+ ou potencial de membrana produzido pelos processos primários de transporte ativo. Uniporte, simporte e antiporte são exemplos de transporte ativo secundário.
- Vários substratos como íons, nutrientes, pequenas moléculas orgânicas, incluindo fármacos e peptídios e proteínas, são transportados por vários transportadores.
- Todos esses transportadores são indispensáveis para a homeostasia. A expressão de um único grupo de transportadores é importante para funções específicas da célula

como contração muscular, absorção de nutrientes e íons pelas células epiteliais intestinais, reabsorção de nutrientes pelas células renais e secreção de ácido pelas células parietais gástricas.

Questões para aprendizagem

1. Descreva as similaridades entre as cinéticas de ação de enzima e processos de transporte. Compare as propriedades dos vários transportadores de glicose com aqueles da hexocinase e glicocinase, ambos cineticamente e em termos de função fisiológica.
2. Identifique vários inibidores de transportadores usados na medicina clínica, tais como bloqueadores de canais de Ca^{2+}, laxantes e inibidores da secreção ácida gástrica.
3. Investigue o processo de transporte de glicose através da barreira hematoencefálica e explique a patogênese do coma hipoglicêmico.
4. Estude o papel e a especificidade dos transportadores ABC na resistência a multifármacos dos agentes quimioterápicos.

Leituras sugeridas

Camargo, S. M., Brockenhauer, D., Kleta, R. Aminoacidurias: clinical and molecular aspects. *Kidney Int*. 2008; 73:918–925.

Hinz, A., Tampe, R. ABC transporters and immunity: mechanism of self-defense. *Biochemistry*. 2012; 51:4981–4989.

Linton, K. J. Structure and function of ABC transporters. *Physiology*. 2007; 22:122–130.

Prassas, I., Diamandis, E. P. Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. *Nat Rev Drug Discov*. 2008; 7:926–935.

Seyberth, H. W., Schlingmann, K. P. Bartter- and Gitelman-like syndromes: salt-losing tubulopathies with loop or DCT defects. *Pediatr Nephrol*. 2011; 26:1789–1802.

Thorens, B., Mueckler, M. Glucose transporters in the 21st century. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010; 298:E141–E145.

Sites

Revisões gerais:

Transport across cell membranes: http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/D/Diffusion.

Membrane transport: www.rpi.edu/dept/bcbp/molbiochem/MBWeb/mb1/part2/carriers.htm.

Human ABC transporters: http://nutrigene.4t.com/humanabc.htm.

P-ATPase: www.traplabs.dk/patbase.

Animações:

www.stolaf.edu/people/giannini/biological%20anamations.html.

www.wiley.com/legacy/college/boyer/0470003790/animations/membrane_transport/membrane_transport.htm.

www.phschool.com/science/biology_place/biocoach/biomembrane1/intro.html.

CAPÍTULO 9

Bioenergética e Metabolismo Oxidativo

L. William Stillway

Objetivos

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever como a termodinâmica está relacionada com nutrição e obesidade.
- Esboçar o sistema de transporte de elétrons mitocondrial mostrando oito dos principais carreadores de elétrons.
- Explicar como a ubiquinona, a heme e o complexo ferro-enxofre participam do transporte de elétrons.
- Definir potencial de membrana e explicar seu papel na síntese de ATP e na termogênese.
- Explicar o papel das proteínas desacopladoras na termogênese.
- Descrever o mecanismo da ATP sintase.
- Descrever os efeitos de inibidores como a rotenona, antimicina A, monóxido de carbono, cianeto e oligomicina no consumo de oxigênio pela mitocôndria.

Introdução

O ATP é a moeda metabólica central

A oxidação de combustíveis metabólicos é essencial para a vida. Em organismos superiores, os combustíveis como os carboidratos e os lipídios são metabolizados para dióxido de carbono e água, gerando a "moeda" metabólica central, trifosfato de adenosina (ATP). A maior parte da energia metabólica é suprida por reações de oxidação-redução (redox) na mitocôndria. A regulação do metabolismo de energia não é de pequeno valor, uma vez que animais de sangue quente apresentam demandas energéticas variáveis em processos como termogênese a baixas temperaturas, estimulação da síntese de ATP durante o estresse e o acoplamento da síntese de ATP com

a frequência respiratória, durante o trabalho ou exercício. Este capítulo proporcionará uma introdução ao conceito de energia livre, fosforilação oxidativa e de transdução de energia de combustíveis em trabalho útil. As vias e as moléculas específicas pelas quais os elétrons são transportados até o oxigênio e o mecanismo de geração de ATP serão descritos e relacionados com as estruturas da mitocôndria, a "casa de força" da célula e a principal fonte de ATP. Finalmente, esses processos bioquímicos serão aplicados à saúde e às doenças humanas.

Oxidação como fonte de energia

Conteúdo energético dos alimentos

A nutrição e os distúrbios como obesidade, diabetes e câncer requerem o conhecimento da termodinâmica. A obesidade, por exemplo, é um distúrbio no qual ocorre um desequilíbrio entre o ganho e o gasto de energia. Desta forma, é importante que o conteúdo energético dos alimentos seja conhecido. Os valores de conteúdo energético comumente aceitos para as quatro principais categorias de alimentos estão mostrados na Tabela 9.1: o álcool está incluído, porque se trata um componente dietético significante para algumas pessoas. Estes valores são obtidos pela combustão completa (oxidação) de amostras de cada alimento. Em termos biológicos, cerca de 40% da energia dos alimentos é conservada como ATP e o restante (60%) é liberado como calor.

Tabela 9.1

Conteúdo energético das principais classes de alimentos

	Combustível metabólico (kJ/g)	Conteúdo energético (kcal/g)
Gorduras	38	9
Carboidratos	17	4
Proteínas	17	4
Álcool	29	7

Note que o termo termodinâmica, kcal (energia necessária para aumentar a temperatura de 1 kg [1 L] de água em 1°C), é equivalente à caloria comum nutricional; isto é, 1 Cal = 1 kcal, 1 kcal = 4,2 kJ.

A taxa metabólica basal (BMR)

A taxa metabólica basal é uma medida do gasto energético diário do corpo em repouso

Praticamente todas as reações do corpo são exotérmicas, e a soma de todas as reações que ocorrem em repouso é denominada taxa metabólica basal (BMR), que pode ser medida por dois métodos básicos: **calorimetria direta**, em que o total de calor liberado por um animal é medido ao longo do tempo, e por **calorimetria indireta**, em que a BMR é

calculada a partir da quantidade de oxigênio consumido que está diretamente relacionado com BMR. Um homem adulto (70 kg) apresenta BMR de cerca de 7.500 kJ (1.800 kcal) e uma mulher, em torno de 5.400 kJ (1.300 kcal) por dia; a BMR pode variar por um fator de dois entre indivíduos, dependendo da idade, do sexo, da massa corporal e da composição. A produção de calor pelas mitocôndrias responde pela maior parte da BMR. A BMR é determinada sob condições controladas: após 8 horas de sono, em posição reclinada, em estado pós-absortivo, geralmente após 12 horas da refeição.

Outro parâmetro frequentemente utilizado é a RMR, ou taxa de metabolismo em repouso, que é virtualmente o mesmo que a BMR, mas determina-se em condições de menor restrição. A TMR é a medida do mínimo gasto de energia em repouso; em geral, corresponde a cerca de 70% do gasto total de energia diário. Pesquisadores em fisiologia do exercício frequentemente empregam o termo **MET** (**equivalentes metabólicos**) como uma medida do gasto de energia em repouso. Uma caminhada, de lenta para vigorosa, é uma atividade de 2-4 MET/h; corrida vigorosa em uma esteira de exercícios pode consumir mais que 15 MET/h.

Estágios da oxidação de combustíveis

A oxidação de combustíveis pode ser dividida em duas etapas gerais: a medula nucleotídia durante a oxidação dos combustíveis e o uso da energia livre da oxidação das coenzimas reduzidas para produzir o ATP (Fig. 9.1).

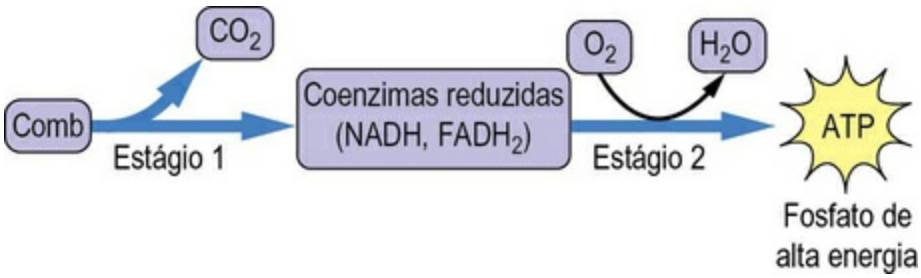


FIG. 9.1 Estágios da oxidação de combustíveis.
NADH, nicotinamida adenina dinucleotídio reduzida; $FADH_2$, flavina adenina dinucleotídio reduzida.

Energia livre

A direção de uma reação depende da diferença entre a energia livre dos reagentes e dos produtos

A energia livre de Gibbs (ΔG) de uma reação é a quantidade máxima de energia que pode ser obtida de uma reação à temperatura e pressão constantes. As unidades de energia livre são de kcal/mol (kJ/mol). Não é possível medir a quantidade de energia livre absoluta de uma substância, mas quando um reagente A reage para formar o produto B, é possível determinar a variação de energia livre nessa reação, ΔG.

Para a reação A → B:

$$\Delta G = GB - GA$$

Em que G_A e G_B são as energias livres de A (reagente) e de B (produto), respectivamente. Todas as reações em sistemas biológicos são consideradas reações reversíveis, de modo que a reação inversa, B → A, é numericamente equivalente, mas com sinal contrário.

Se há maior concentração de B que A no equilíbrio, isto é Keq > 1, a conversão A → B é favorável – ou seja, a reação tende a ocorrer a partir de uma condição padrão, na qual A e B estão em iguais concentrações. Nesse caso, a reação é considerada espontânea ou exergônica, e a energia livre dessa reação é definida como negativa: isto é, $\Delta G < 0$, indicando que a energia é liberada pela reação. Contrariamente, se a concentração de A for maior que a de B no equilíbrio, a reação direta é considerada desfavorável, não espontânea ou endergônica, e a reação tem uma energia livre positiva: isto é, quando as concentrações de partida são iguais, B tende a formar A, mais que A de formar B. Neste caso, um consumo de energia seria necessário para direcionar a reação A → B a partir da posição de equilíbrio para um estado padrão no qual A e B estão presentes em iguais concentrações. O total de energia livre disponível a partir de uma reação depende tanto de sua tendência de ocorrer diretamente a partir do estado padrão (ΔG) e da quantidade (moles) de reagente convertido no produto.

A energia livre de reações metabólicas está relacionada com suas constantes de equilíbrio pela equação de Gibbs

As medidas termodinâmicas baseiam-se em condições-padrão nas quais os reagentes e os produtos estão presentes em concentração 1 molar, a pressão de todos os gases é de 1 atmosfera e a temperatura é de 25°C (298 K). Mais comumente, as concentrações dos reagentes e dos produtos são então medidas após ser alcançado o estado de equilíbrio. A energia livre padrão é representada pelo símbolo $\Delta G°$ e as variações biológicas de energia livre padrão são representadas pelo símbolo $\Delta G°'$, com o apóstrofo no símbolo designando pH 7,0. A energia livre disponível de uma reação pode ser calculada a partir de sua constante de equilíbrio pela equação de Gibbs:

$$\Delta G^{\circ\prime} = -RT\ln K'_{eq}$$

Em que T é a temperatura absoluta (°Kelvin), $\ln K'_{eq}$ é o logaritmo natural da constante de equilíbrio, para a reação em pH 7, e R é a constante dos gases ideal:

$$R = (8{,}3\ J\ mol^{-1}/K \text{ ou } \sim 2\ cal\ mol^{-1}/K).$$

Vários intermediários metabólicos comuns estão listados na Tabela 9.2, acompanhados das constantes de equilíbrio e suas energias livres para suas reações de hidrólise. Estes intermediários com variações de energia livre iguais ou maiores ao do ATP, o transdutor de energia central da célula, são considerados **compostos de alta energia** e, em geral, apresentam ligações anidrido ou tioéster. Os compostos de baixa energia listados são todos ésteres de fosfato e, comparativamente, não produzem tanta energia livre quando hidrolisados. A reação de hidrólise da glicose-6-fosfato (Glc-6-P) é escrita como:

Tabela 9.2

Termodinâmica das reações de hidrólise

Metabólito	K'eq	ΔG°' (kJ mol^{-1})	(kcal mol^{-1})
Fosfoenolpiruvato	$1{,}2 \times 10^{11}$	–61,8	–14,8
Fosfocreatina	$9{,}6 \times 10^{8}$	–50,2	–12,0
1,3-bisfosfoglicerato	$6{,}8 \times 10^{8}$	–49,3	–11,8
Pirofosfato	$9{,}7 \times 10^{5}$	–33,4	–8,0
Acetil coenzima A	$4{,}1 \times 10^{5}$	–31,3	–7,5
ATP	$2{,}9 \times 10^{5}$	–30,5	–7,3
Glicose-1-fosfato	$5{,}5 \times 10^{3}$	–20,9	–5,0
Frutose-6-fosfato	$7{,}0 \times 10^{2}$	–15,9	–3,8
Glicose-6-fosfato	$3{,}0 \times 10^{2}$	–13,8	–3,3

Constantes de equilíbrio e energia livre de hidrólise de vários intermediários metabólicos em pH 7 (ΔG°').

$$Glc-6-P + H_2O \rightarrow Glicose + Pi$$

Esta reação tem uma energia livre negativa e ocorre espontaneamente. A reação inversa, a síntese da Glc-6-P a partir da glicose, requer gasto de energia.

Conservação de energia pelo acoplamento com a adenosina trifosfato

O ATP é um produto de reações catabólicas e a força motriz das reações biossintéticas

Os sistemas vivos precisam transferir energia de uma molécula para outra sem perdê-la toda como calor. Alguma energia deve ser conservada em uma forma química, de modo a

promover reações biossintéticas não espontâneas. De fato, cerca da metade da energia obtida por oxidação de combustíveis metabólicos é canalizada para a síntese de **ATP, um transdutor universal de energia em sistemas vivos.** O ATP é frequentemente mencionado como uma moeda comum de energia metabólica, porque este é utilizado para suprir várias das reações dependentes de energia. O ATP consiste em uma base purínica, a adenina, a ribose, açúcar de cinco carbonos, e grupos de fosfato α, β e γ (Fig. 9.2). As duas ligações fosfoanidrido são ditas ligações de alta energia, porque suas hidrólises geram uma grande variação negativa de energia livre. Quando o ATP é utilizado para o trabalho metabólico, estas ligações de alta energia são quebradas e o ATP é convertido para ADP ou para AMP.

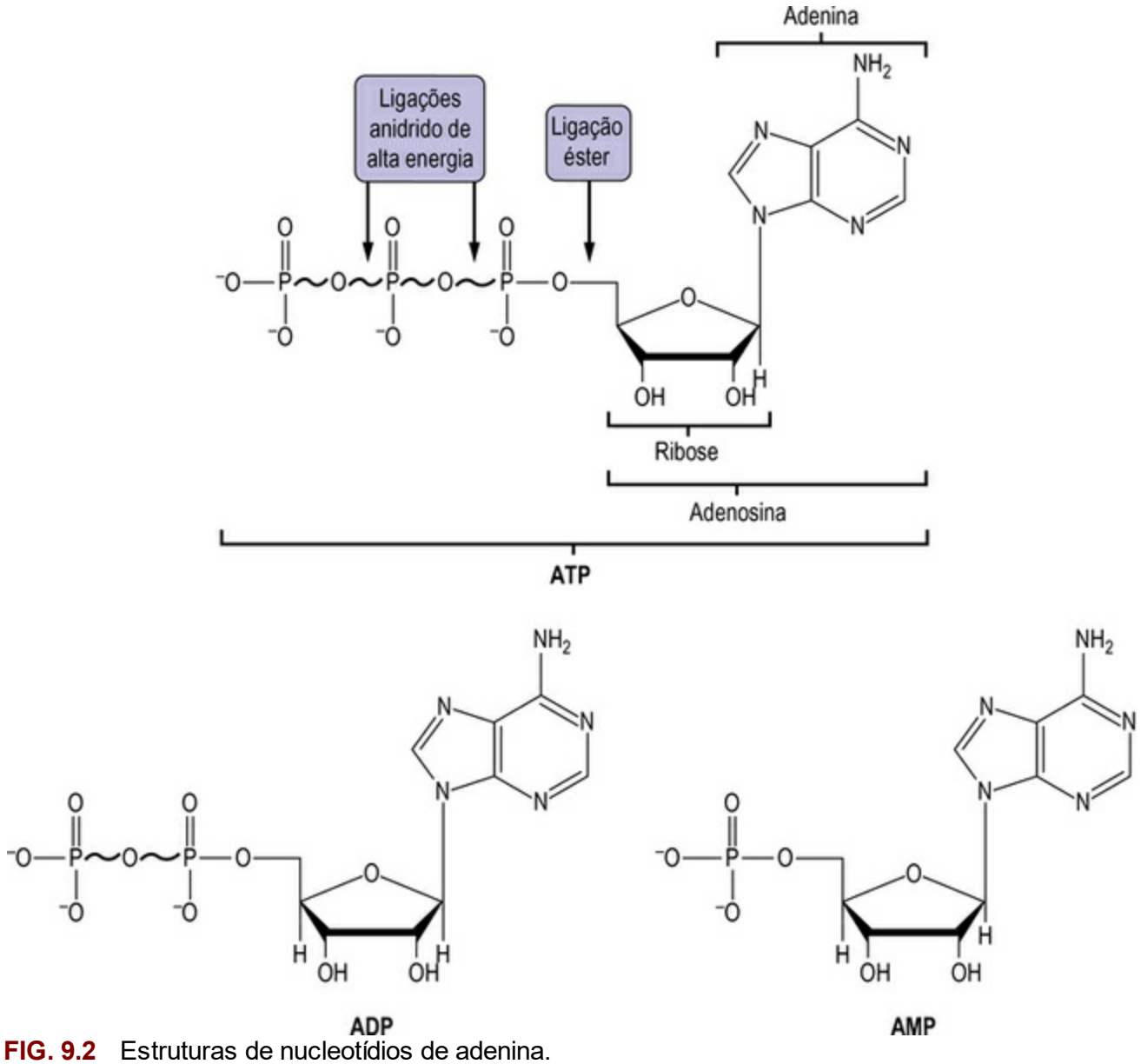


FIG. 9.2 Estruturas de nucleotídios de adenina.
É apresentado o ATP, assim como os produtos de sua hidrólise, o difosfato de adenosina (ADP) e o monofosfato de adenosina (AMP). O ATP contém duas ligações anidrido fosfórico de alta energia; o ADP contém uma; o AMP, apenas uma ligação fosfoéster de baixa energia.

A energia livre de ligações de alta energia, tais como as ligações de fosfato anidrido do ATP, pode ser utilizada para promover ou "empurrar adiante" reações que, de outra

forma, não seriam espontâneas. De fato, praticamente todas as vias biossintéticas são termodinamicamente desfavoráveis, mas se tornam favoráveis pelo acoplamento a várias reações com a hidrólise de compostos de alta energia. Por exemplo, o primeiro passo no metabolismo da glicose é a síntese de Glc-6-P (Fig. 3.4). Como mostrado na Tabela 9.2, esta não é uma reação espontânea: a hidrólise de Glc-6-P ($\Delta G°'$ = –13,8 kJ/mol ou –3,3 kcal/mol) é uma reação espontânea. Entretanto, como mostrado adiante, a síntese de Glc-6-P (reação I) pode ser **acoplada energeticamente** à hidrólise de ATP (reação II), produzindo uma "reação líquida" III que é favorável para a síntese de Glc-6-P:

	$\Delta G°'$
$I: Glc + Pi \rightarrow Glc-6-P + H_2O$	$+3,3 kcal/mol$
$II: ATP + H_2O \rightarrow ADP + Pi$	$-7,3 kcal/mol$
$Líquido: Glc + ATP \rightarrow Glc-6-P + ADP$	$-4 kcal/mol$

Isto é possível em virtude da alta energia livre do "potencial de transferência de grupo" do ATP. A transferência física do fosfato do ATP para a glicose ocorre em um local ativo de uma enzima cinase, como a glicocinase. Esta característica, em que o ATP é utilizado para promover reações biossintéticas, processos de transporte ou atividade muscular, ocorre normalmente em vias metabólicas.

Síntese mitocondrial de trifosfato de adenosina a partir de coenzimas reduzidas

A fosforilação oxidativa é o mecanismo pelo qual a energia derivada da oxidação de combustíveis é conservada na forma de ATP

O metabolismo de carboidratos começa no citoplasma através da via glicolítica (Cap. 12); enquanto a energia produzida a partir de ácidos graxos ocorre exclusivamente na mitocôndria. As mitocôndrias são organelas subcelulares, com tamanho similar ao das bactérias. Elas são essenciais para o metabolismo aeróbico nos eucariontes. Sua principal função é oxidar combustíveis metabólicos e conservar a energia livre sintetizando ATP.

As mitocôndrias são limitadas por um sistema de dupla membrana (Fig. 9.3). A membrana externa (MME) contém enzimas e proteínas de transporte e através da proteína porina (P), formadora de poro, são virtualmente permeáveis a todos os íons, pequenas moléculas (S) e a proteínas menores que 10.000 Da. As proteínas grandes precisam ser transportadas *via* complexos **TMME** (translocase na membrana mitocondrial externa) e por **TMMI** (translocases na membrana mitocondrial interna). Isto é especialmente vital para a célula, porque quase todas as proteínas mitocondriais são codificadas no núcleo e precisam ser transportadas para o interior da mitocôndria. O

genoma mitocondrial, mtDNA, codifica 13 subunidades vitais de bombas de prótons e ATP sintase. A **membrana mitocondrial interna (MMI)** é pregueada por estruturas conhecidas como **cristas** e é impermeável à maioria dos íons e moléculas pequenas como os nucleotídios (incluindo-se o ATP), coenzimas, fosfato e prótons. As proteínas transportadoras são necessárias para facilitar seletivamente a translocação de moléculas específicas através da membrana interna. A membrana interna também contém componentes da fosforilação oxidativa – o processo pelo qual coenzimas nucleotídios reduzidos são oxidadas e o ATP sintetizado.

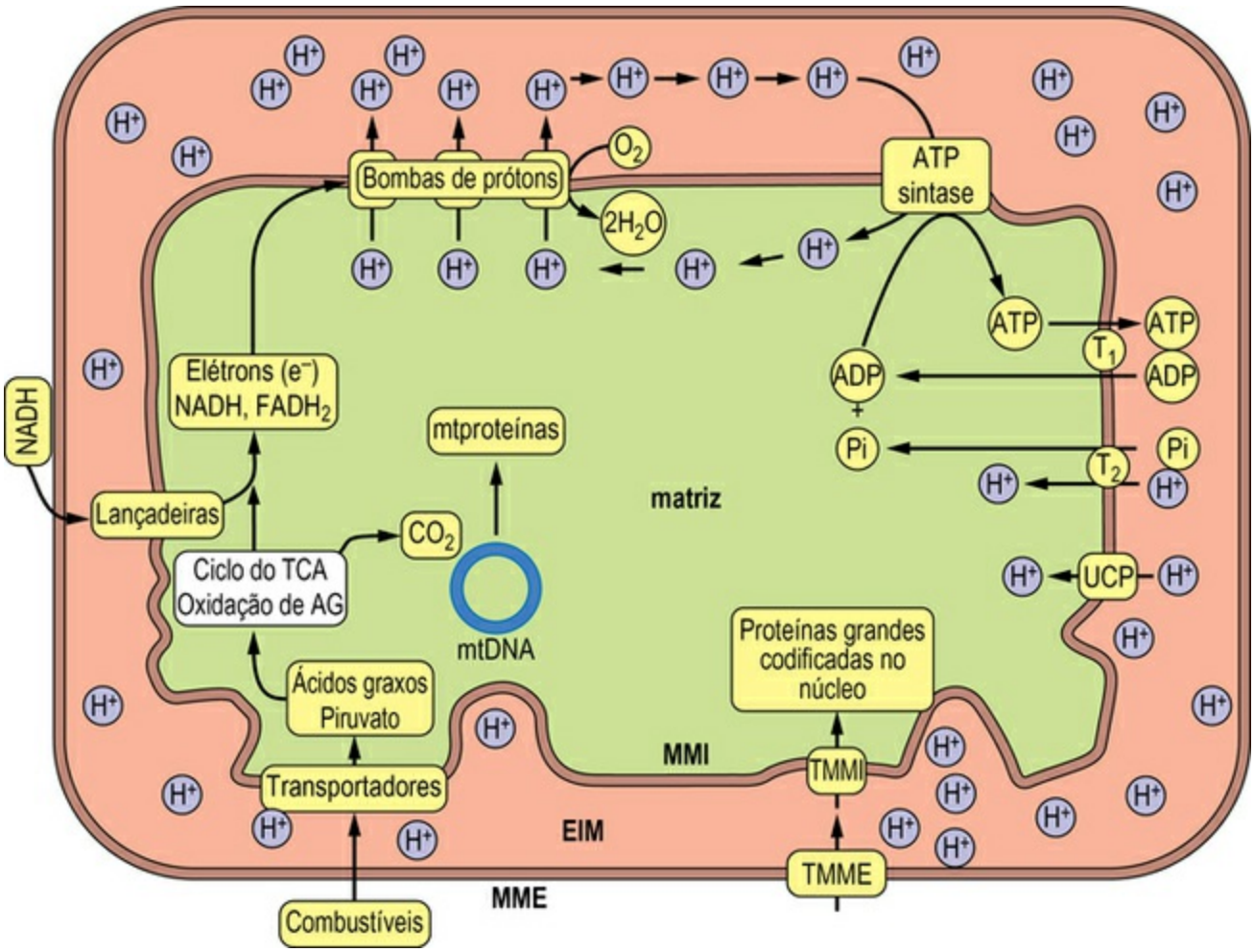


FIG. 9.3 Estrutura mitocondrial e vias de transdução de energia: o mecanismo de fosforilação oxidativa.

Os principais combustíveis, tais como piruvato de carboidratos e ácidos graxos (FA) de triglicerídios, são transportados para o interior da matriz onde são oxidados para gerar CO_2 e as coenzimas de nucleotídios reduzidos NADH e $FADH_2$. A oxidação desses nucleotídios através do sistema de transporte de elétrons reduz oxigênio à água e bombeia prótons por três bombas para fora da matriz e dentro do espaço intermembrana (EIM), criando um gradiente de pH, que é o principal contribuinte para o potencial de membrana. Deve-se notar que os elétrons no espaço intermediário difundem-se livremente através da membrana externa *via* proteína porina, um canal de prótons; desta forma, o espaço intermediário é bastante equivalente ao citosol. Embora o potencial de membrana seja composto principalmente de gradiente de prótons, este é constituído de vários gradientes eletroquímicos e é expresso como uma voltagem. O controlado influxo de prótons através da ATP sintase potencializa a síntese de ATP pela ATP sintase (F-ATPase, Tabela 8.3). O ATP mitocondrial é então trocado pelo ADP citoplasmático através da ADP-ATP translocase (T_1). O fosfato (Pi), que é também necessário para a síntese de ATP, é transportado pela fosfato translocase (T_2). A membrana interna também contém proteínas desacopladoras (UCPs) que podem ser utilizadas para possibilitar a fuga de prótons retornando à matriz. MME, membrana mitocondrial externa; MMI, membrana mitocondrial interna; *mt*proteínas, proteínas mitocondriais; *mt*DNA, DNA mitocondrial; TMME e TMMI, complexos de proteínas translocase nas membranas mitocondriais externa e interna; TCA, ciclo do ácido tricarboxílico.

Quadro de conceitos avançados

Exercício e biogênese mitocondrial

Há muito se sabe que o exercício aumenta a capacidade oxidativa dos músculos

esqueléticos, por induzir a biogênese mitocondrial. O exercício contínuo resulta em consumo de energia e acúmulo de AMP. A proteína cinase ativada por AMP é um sensor de combustíveis, desempenhando um papel crítico na iniciação de síntese de novos componentes de transporte mitocondrial como o heme. Tais mecanismos são importantes não apenas nos exercícios de treinamento, mas também na regeneração de tecidos após lesão tissular, tais como em trauma, infartos e acidente vascular cerebral.

Transdução de energia a partir de coenzimas reduzidas para fosfatos de alta energia

NAD^+, FAD e FMN são as principais coenzimas redox

As principais coenzimas redox envolvidas na transdução de energia a partir de combustíveis para o ATP são: nicotinamida adenina dinucleotídio (NAD^+), flavina adenina e flavina mononucleotídio (FMN) (Fig. 9.4). Durante o metabolismo energético, os elétrons são transferidos dos carboidratos e das gorduras para essas coenzimas, reduzindo-as para NADH, $FADH_2$, e $FMNH_2$. Em cada caso, dois elétrons são transferidos, mas difere o número de prótons transferidos. O NAD^+ aceita um íon hidreto (H^-) que consiste em um próton e em dois elétrons; o próton remanescente é liberado na solução. O FAD e o FMN recebem dois elétrons e dois prótons.

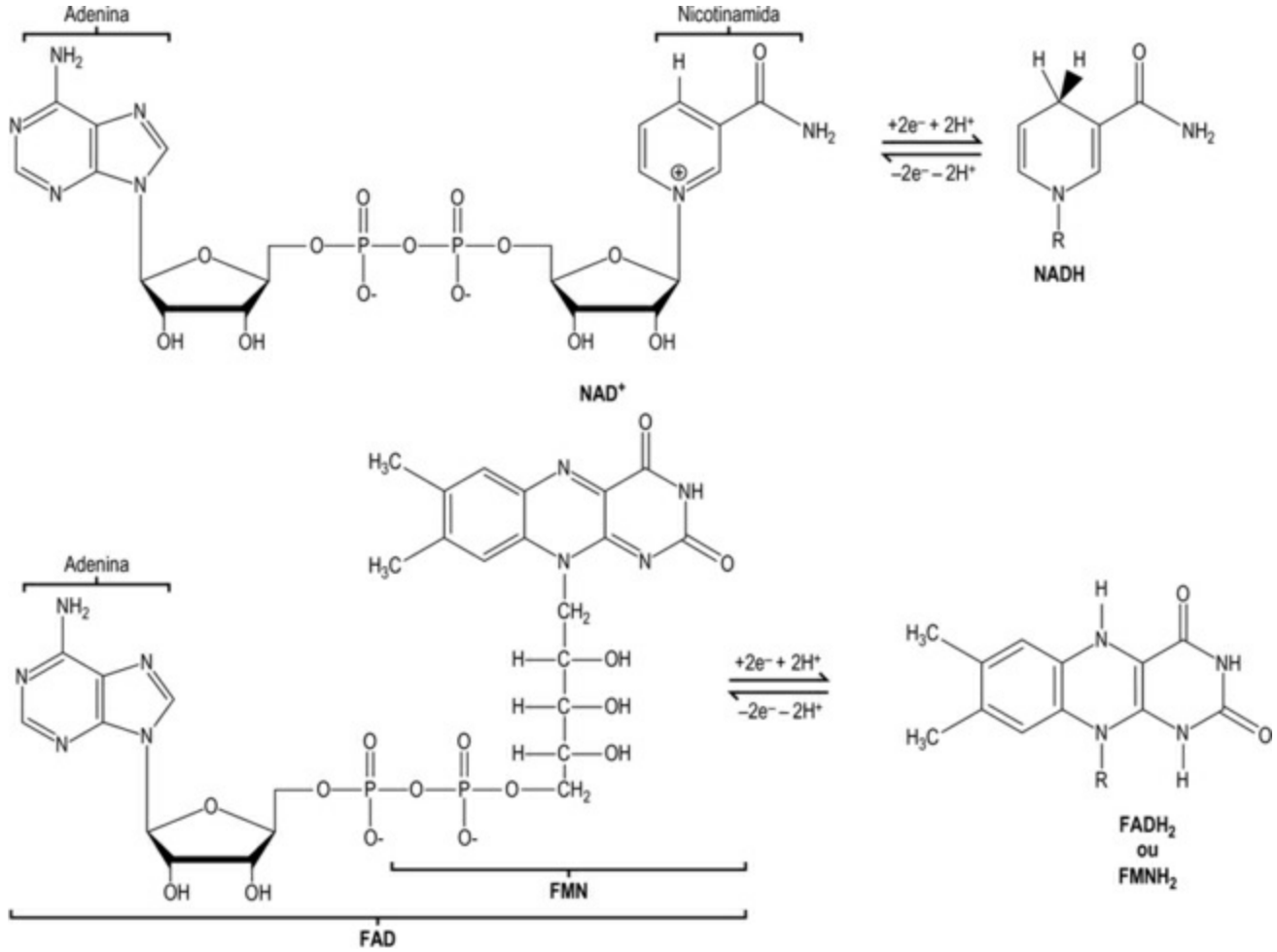


FIG. 9.4 As estruturas das coenzimas redox.
NAD^+ e sua forma reduzida, NADH (nicotinamina adenina dinucleotídio), consistem em adenina, duas unidades de ribose, dois fosfatos e nicotinamida. O FAD e sua forma reduzida, $FADH_2$ (adenina e flavina dinucleotídio), consistem em riboflavina, dois fosfatos, ribose e adenina. FMN e $FMNH_2$ consistem em fosfato de riboflavina. Os componentes dessas coenzimas, nicotinamida e riboflavina, são oxidados e reduzidos, reversivelmente, durante as reações de transferência de elétrons (redox). O NADH e o $FADH_2$ são frequentemente denominados nucleotídios reduzidos ou coenzimas reduzidas.

Quadro de conceitos avançados

A função metabólica do atp requer magnésio

O ATP prontamente forma um complexo com o íon magnésio e tal complexo é necessário em todas as reações nas quais o ATP participa, incluindo a sua síntese. Uma deficiência em magnésio impede virtualmente todo o metabolismo, visto que o ATP nem pode ser formado nem utilizado em quantidades adequadas.

A oxidação de nucleotídios reduzidos pelo sistema de transporte de elétrons produz uma grande quantidade de energia livre. Quando a oxidação de 1 mol de NADH é acoplada à redução de 0,5 mol de oxigênio para formar água, a energia produzida é teoricamente suficiente para sintetizar sete moléculas de ATP:

$$NADH + H^+ + \tfrac{1}{2} O_2 \rightarrow NAD^+ + H_2O$$
$$\Delta G^{\circ\prime} = -220\ \text{kJ/mol}\ (-52,4\ \text{kcal/mol})$$
$$ADP + Pi \rightarrow ATP + H_2O$$
$$\Delta G^{\circ\prime} = -30,5\ \text{kJ/mol}\ (-7,3\ \text{kcal/mol})$$

Dividindo-se 220 kJ/mol do ΔG°', disponível a partir da oxidação do NADH, por ΔG°' 30,5, necessária para a síntese de ATP, o rendimento é teoricamente ~7 mol ATP/mol NADH. Como discutido adiante, a produção real é mais próxima de 2,5 mol ATP/mol NADH oxidado.

A energia livre da oxidação do NADH é utilizada via sistema de transporte de elétrons para bombear prótons no espaço intermembrana. A energia produzida quando esses prótons retornam à matriz mitocondrial é utilizada para sintetizar ATP. Este processo é conhecido como fosforilação oxidativa (Fig. 9.3).

O sistema mitocondrial de transporte de elétrons

A cadeia transportadora de elétrons mitocondriais transfere elétrons de nucleotídios reduzidos para o oxigênio, em uma sequência bem definida, com várias etapas

O sistema de transporte de elétrons completo, também conhecido como cadeia de transporte de elétrons ou cadeia respiratória, está localizado na membrana mitocondrial interna (Fig. 9.5). Este consiste em vários complexos proteicos grandes e em dois componentes pequenos e independentes – ubiquinona e citocromo *c*. Os componentes proteicos são muito complexos: o complexo I, por exemplo, que aceita elétrons do NADH, contém, no mínimo, 46 subunidades. Cada etapa na cadeia de transporte de elétrons envolve uma reação redox na qual deixa os componentes com potenciais de redução mais negativos e caminha para componentes com potenciais de redução mais positivos. Os elétrons são conduzidos por esse sistema em uma sequência definida dos nucleotídios reduzidos até o oxigênio, e as variações de energia livre promovem o transporte de prótons desde a matriz até o interior do espaço intermembrana através de três bombas de prótons. Após cada etapa, os elétrons ficam em estado de menor energia.

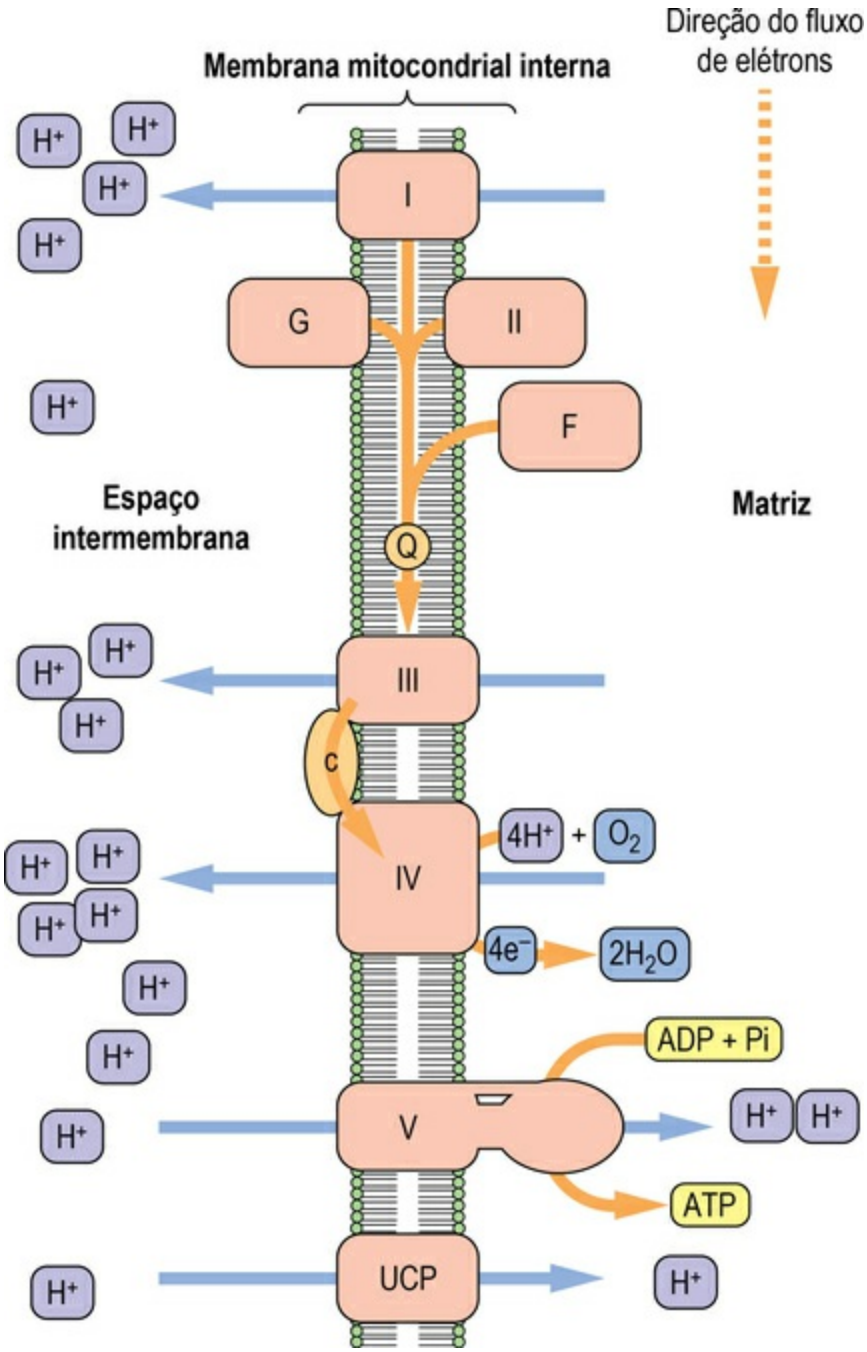


FIG. 9.5 Uma seção da membrana interna mitocondrial com o sistema de transporte de elétrons e a ATP sintase.
I, complexo I; II (succinato desidrogenase), complexo II; III, complexo III; IV, complexo IV; V, complexo V ou ATP sintase; G, glicerol 3-fosfato desidrogenase; F, acil CoA desidrogenase; Q, ubiquinona; c, citocromo *c*; UCP, proteína desacopladora.

Os elétrons são dirigidos na cadeia de transporte de elétrons por várias flavoproteínas

Existem quatro flavoproteínas na cadeia transportadora de elétrons: o Complexo I contém FMN e os outros três contêm FAD. Todas essas flavoproteínas reduzem a pequena e lipofílica molécula de **ubiquinona (Q ou coenzima Q_{10}),** no início da via comum de transporte de elétrons, consistindo em Q, complexo III, citocromo *c* e complexo IV.

$$\text{Flavoproteína}_{(\text{reduzida})} + Q \rightarrow \text{Flavoproteína}_{(\text{oxidada})} + QH_2$$

Os prótons são bombeados da matriz para dentro do espaço intermembrana pelos complexos I, III e IV. O oxigênio (O_2) é o aceptor final de elétron no final da cadeia e é reduzido em duas moléculas de água pela transferência de quatro elétrons a partir do complexo IV e quatro prótons do compartimento da matriz mitocondrial.

A eficiência da fosforilação oxidativa pode ser medida dividindo-se a quantidade de fosfato incorporado ao ADP pela quantidade de oxigênio atômico reduzido. Um átomo de oxigênio é reduzido por dois elétrons (um par de elétrons).

$$ADP + Pi + 1/2O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow ATP + H_2O$$

Para cada par de elétrons transportados através dos complexos I, III e IV, um número suficiente de prótons é bombeado por cada complexo para a síntese de aproximadamente um mol de ATP. Se o transporte de elétrons começa com um par de elétrons do NADH, aproximadamente 2,5 mol de ATP são sintetizados, enquanto um par de elétrons de qualquer das outras três flavoproteínas, contendo $FADH_2$, produz cerca de 1,5 mol de ATP, porque a capacidade de bombeamento de elétrons do complexo I é deixada de lado.



Quadro clínico

Deficiência de ferro leva à anemia

Uma mulher de 45 anos se queixa de cansaço e apresenta-se pálida. Ela é vegetariana e está apresentando fluxo menstrual mensal intenso e prolongado. Seu hematócrito é de 0,32 (a referência varia de 0,36-0,46) e sua concentração de hemoglobina é de 9 g/L (variação normal 120-160 g/L; 12-16 g/dL).

Comentário

A anemia por deficiência de ferro é um problema nutricional corriqueiro e é especialmente comum em mulheres que menstruam e em grávidas, devido à necessidade aumentada de ferro da dieta. Os homens necessitam de cerca de 1 mg de ferro/dia, as mulheres que menstruam necessitam de cerca de 2 mg/dia, e as gestantes, de 3 mg/dia. O ferro é necessário para que sejam mantidas quantidades normais de hemoglobina, citocromos e complexos ferro-enxofre que são fundamentais para o transporte de oxigênio e metabolismo energético. Todos esses processos ficam prejudicados pela deficiência de ferro. O ferro do heme, que é encontrado em carnes, é absorvido muito mais eficientemente que o ferro inorgânico, tal como encontrado em gema de ovo, vegetais e nozes. Para valores de referência de hematologia, consulte a Tabela 5.2.

Flavoproteínas contêm grupos prostéticos FAD ou FMN

O complexo I, também chamado de NADH-Q redutase ou NADH desidrogenase, é uma flavoproteína contendo FMN. Esse complexo oxida o NADH mitocondrial e transfere elétrons através de complexos de FMN e de ferro-enxofre (FeS) para a ubiquinona, fornecendo energia suficiente para bombear quatro prótons da matriz na reação:

$$NADH + Q + 5H^+_{\text{matriz}} \rightarrow NAD^+ + QH_2 + 4H^+_{\text{espaço intermembrana}}$$

Três outras flavoproteínas transferem elétrons de substratos oxidados *via* $FADH_2$ para a ubiquinona (Q) (Fig. 9.5):

- Succinato-Q redutase (complexo II ou succinato desidrogenase do ciclo TCA) (Cap. 14) oxida o succinato para fumarato e reduz FAD a $FADH_2$
- Glicerol-3-fosfato-Q redutase, uma parte da lançadeira do glicerol-3-P (ver adiante), oxida o glicerol-3-P a fosfato de di-hidroxiacetona (DHAP) e reduz FAD a $FADH_2$
- Acil CoA desidrogenase catalisa o primeiro passo na oxidação mitocondrial de ácidos graxos e também produz $FADH_2$.



Quadro clínico

Uma rara deficiência de q_{10}

Um menino de 4 anos apresentou-se com convulsões, fraqueza muscular progressiva e encefalopatia. O acúmulo de lactato, um produto do metabolismo anaeróbico da glicose no líquido cefalorraquidiano (LCR) sugeriu defeito no metabolismo oxidativo mitocondrial. Mitocôndrias de músculo foram isoladas para estudo. As atividades individuais dos complexos I, II, III e IV estavam normais, mas as atividades combinadas de I + III e de II + III estavam significantemente diminuídas. O tratamento com coenzima Q_{10} melhorou a fraqueza muscular, mas não a encefalopatia.

Comentário

Fraqueza muscular grave e encefalopatia, ou ambas, podem ser causadas pela chamada miopatia mitocondrial por defeitos mitocondriais envolvendo o sistema de transporte de elétrons. O aumento do lactato no LCR sugere um defeito na fosforilação oxidativa. As atividades diminuídas dos complexos I + III e de II + III sugerem uma deficiência de coenzima Q_{10}, que foi confirmada por medidas diretas.



Quadro de conceitos avançados

Complexos ferro-enxofre

Complexos ferro-enxofre participam em reações redox

O ferro é um importante constituinte das hemeproteínas, tais como hemoglobina, citocromos e catalase, mas está também associado a complexos ferro-enxofre (FeS) ou a não hemeproteínas, as quais funcionam como carreadoras de elétrons no sistema de transporte de elétrons mitocondrial. Os tipos Fe_2S_2 e Fe_4S_4 são mostrados na Figura 9.6. Em cada caso, o centro ferro-enxofre é ligado a um peptídio através de resíduos de cisteína. Os complexos FeS sofrem distorção reversível e relaxamento durante as reações redox. Diz-se que a energia redox é conservada na "energia conformacional" da proteína.

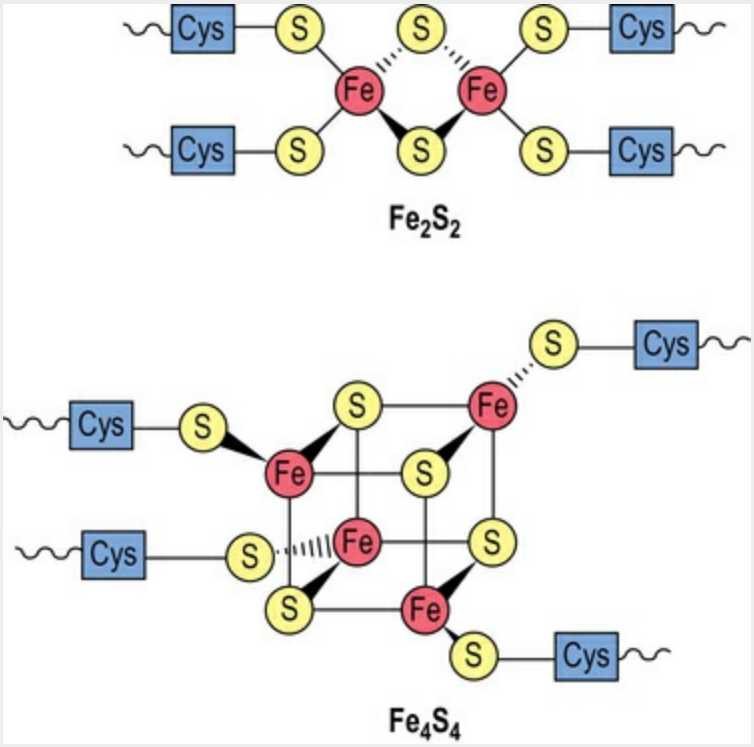


FIG. 9.6 Complexos ferro-enxofre.
Cys, cisteína.

Tanto o FMN quanto o FAD contêm a vitamina hidrossolúvel riboflavina. Uma deficiência de riboflavina na dieta pode prejudicar gravemente as funções destas e de outras flavoproteínas.

Transferência de elétrons do nadh para a mitocôndria

Lançadeiras de elétrons

As lançadeiras de elétrons são necessárias à oxidação mitocondrial do NADH produzido no compartimento citoplasmático

O NADH é produzido no citosol durante o metabolismo de carboidratos. O NADH não

pode atravessar a membrana mitocondrial interna e, desta forma, não pode ser oxidado pelo sistema de transporte de elétrons. Duas lançadeiras redox possibilitam a oxidação do NADH citosólico sem a sua transferência para o interior da mitocôndria. A propriedade característica dessas lançadeiras é que são potencializadas por isoformas, citoplasmática e mitocondrial, da mesma enzima, que catalisam reações opostas em lados opostos da membrana. A lançadeira de glicerol-3-fosfato é a mais simples das duas (Fig. 9.7, alto). Esta transfere os elétrons do NADH do citoplasma para a mitocôndria, reduzindo FAD a $FADH_2$. A glicerol-3-fosfato desidrogenase catalisa a redução da di-hidroxiacetona-P (DHAP) com NADH para glicerol-3-P, regenerando NAD^+. A glicerol-3-fosfato citoplasmática é reoxidada a DHAP por outra isoforma da glicerol-3-fosfato na face externa da membrana mitocondrial interna; esta enzima é uma flavoproteína na qual o FAD é reduzido a $FADH_2$. Os elétrons são então transferidos para a via comum pela ubiquinona. Como os elétrons são transferidos ao FAD, o rendimento de ATP a partir do NADH por esta via é de aproximadamente 1,5 mol, em vez dos 2,5 mol disponíveis a partir do NADH mitocondrial através do complexo NADH-Q redutase (complexo I).

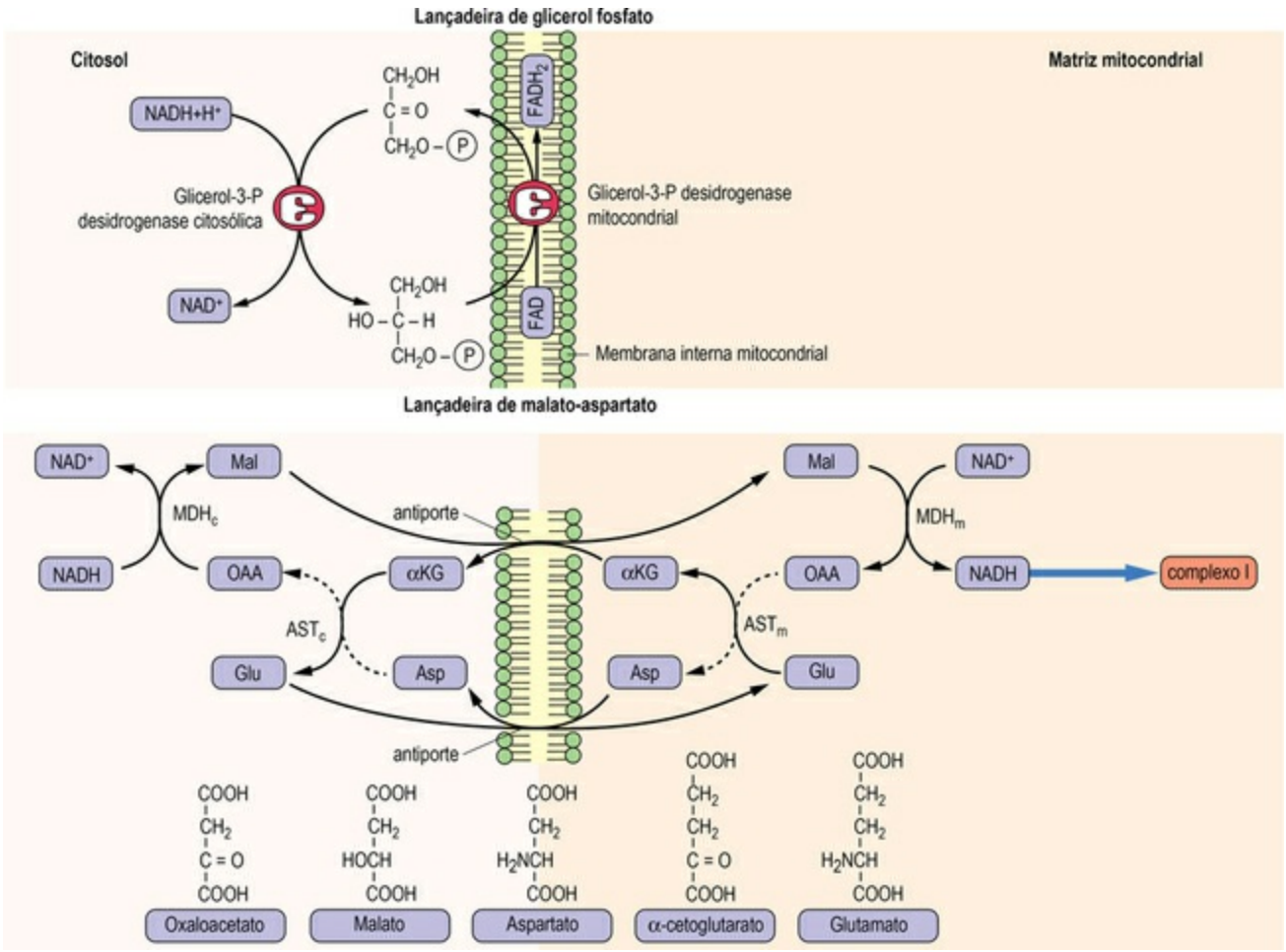


FIG. 9.7 Lançadeiras redox na membrana mitocondrial interna.
(Alto) A lançadeira glicerol fosfato. (Baixo) A lançadeira malato-aspartato. MDH, malato desidrogenase; AST, aspartato aminotransferase. Os subíndices c e m se referem a isozimas citosólicas e mitocondriais.

Muitas células (p. ex., musculoesqueléticas) utilizam a lançadeira de glicerol-3-fosfato, mas o coração e o fígado dependem da lançadeira de malato-aspartato (Fig. 9.7, abaixo),

que produz 2,5 mol de ATP por mol de NADH. Esta lançadeira é mais complicada, uma vez que o substrato, o malato, pode atravessar a membrana mitocondrial interna, mas a membrana é impermeável ao produto, oxaloacetato – não há um transportador de oxaloacetato. A troca é então alcançada pela interconversão entre α-ceto- e α-aminoácidos, envolvendo glutamato citoplasmático e mitocondrial e α-cetoglutarato, e isoenzimas da glutamato-oxaloacetato transaminase (aspartase aminotransferase).

A ubiquinona (coenzima Q_{10})

A ubiquinona transfere elétrons das flavoproteínas para o complexo III

A ubiquinona é assim chamada porque é ubíqua em virtualmente todos os sistemas vivos. Esta é um pequeno composto lipídio-solúvel encontrado na membrana mitocondrial interna de mitocôndrias animais e de plantas e na membrana plasmática de bactérias. A forma primária da ubiquinona de mamíferos contém uma cadeia lateral de 10 unidades de isopreno e é frequentemente chamada de CoQ_{10}. Esta se difunde no interior da membrana interna, recebe elétrons das quatro principais flavoproteínas mitocondriais e os transfere para o complexo III (QH_2-citocromo *c* redutase) A ubiquinona pode carrear tanto um quanto dois elétrons (Fig. 9.8) e considera-se a maior fonte de radicais superóxidos na célula (Cap. 37).

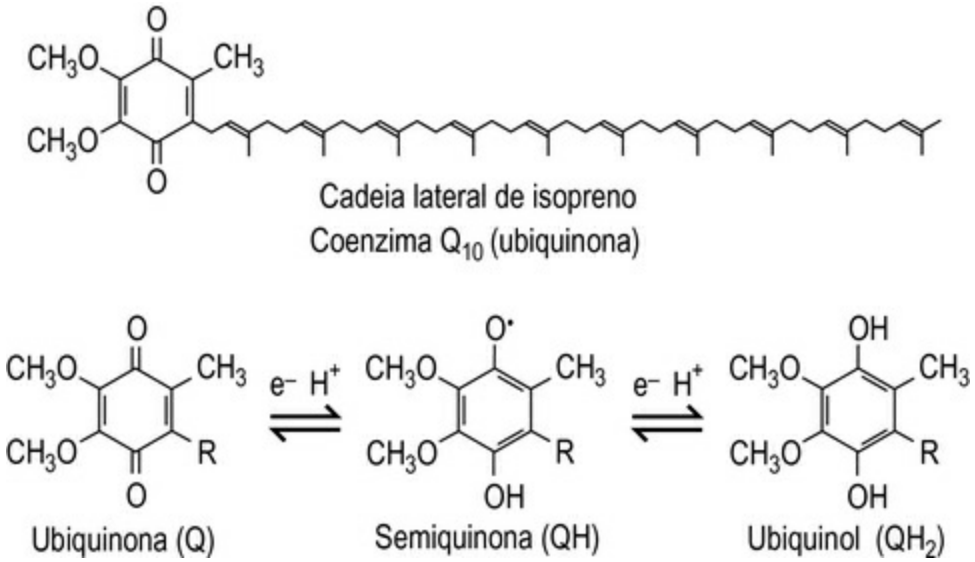


FIG. 9.8 **Coenzima Q10 ou ubiquinona** recebe um ou dois elétrons, transferindo-os das flavoproteínas para o complexo III. A forma semiquinona é um radical livre.

Complexo III – citocromo *c* redutase

O complexo III aceita elétrons da ubiquinona e bombeia quatro íons hidrogênio através da membrana mitocondrial interna

Este complexo enzimático, também conhecido como ubiquinona-citocromo *c* redutase ou

QH_2-citocromo *c* redutase, oxida ubiquinona e reduz o citocromo *c*. A ubiquinona reduzida converge os elétrons que recebe a partir das flavoproteínas mitocondriais e os transfere para o complexo III. Os elétrons da ubiquinona são transferidos através de duas espécies de citocromo *b*, para um centro Fe-S, para o citocromo c_1 e, finalmente, para o citocromo *c*. O transporte de dois elétrons para o citocromo *c* produz suficiente variação de energia livre e bombeamento de prótons para sintetizar cerca de um mol de ATP. A reação geral é:

$$QH_2 + 2\text{cit}\,c_{\text{oxidado}} + 2H^+_{\text{matriz}} \rightarrow$$
$$2Q + 2\text{cit}\,c_{\text{reduzido}} + 4H^+_{\text{espaço intermembrana}}$$

Quatro prótons são bombeados durante esta reação, dois a partir da ubiquinona totalmente reduzida e dois a partir da matriz.

Citocromo *c*

O citocromo c é uma proteína periférica de membrana, lançando elétrons do complexo III para o complexo IV

O citocromo *c*, uma hemeproteína pequena frouxamente ligada à superfície externa da membrana interna, lança elétrons do complexo III para o complexo IV. Cada citocromo *c* carreia somente um elétron; então, a redução de O_2 para $2H_2O$ pelo complexo IV necessita de quatro moléculas de citocromo *c* reduzido. A ligação do citocromo *c* aos complexos III e IV é bastante eletrostática, envolvendo numerosos resíduos de lisina na superfície proteica. A redução do ferricitocromo *c* (Fe^{3+}) para ferrocitocromo *c* (Fe^{2+}) pelo citocromo c_1 leva à mudança na estrutura tridimensional, distribuição de cargas e momento dipolo da proteína, promovendo a transferência de elétrons para o citocromo *a* do complexo IV (Fig. 9.5). Em resposta ao estresse oxidativo e à lesão celular (Cap. 37), o citocromo *c* pode ser liberado do interior da membrana mitocondrial e escapar para o citosol, induzindo apoptose (morte celular).

Quadro de conceitos avançados

Citocromos

Os citocromos, encontrados em mitocôndria e retículo endoplasmático, são proteínas que contêm grupos heme, mas que não estão envolvidas no transporte de oxigênio (Fig. 9.9). A estrutura central desses grupos heme é um anel tetrapirrólico similar ao da hemoglobina, algumas vezes diferindo somente na composição das cadeias laterais. O grupo heme dos citocromos *b* e c_1 é conhecido como ferro

protoporfirina IX e trata-se do mesmo heme encontrado na hemoglobina, mioglobina e catalase. O citocromo *c* contém heme C, que é ligado covalentemente à proteína através de resíduos de cisteína. Os citocromos *a* e a_3 contêm heme A que, em comum com a ubiquinona, contêm uma cadeia lateral de isopreno que é hidrofóbica. Na hemoglobina e mioglobina, o heme deve permanecer no estado ferroso (Fe^{2+}); nos citocromos, o íon ferro é reduzido e oxidado, reversivelmente, entre os estados Fe^{2+} e Fe^{3+} à medida que os elétrons são lançados de uma proteína para a outra.

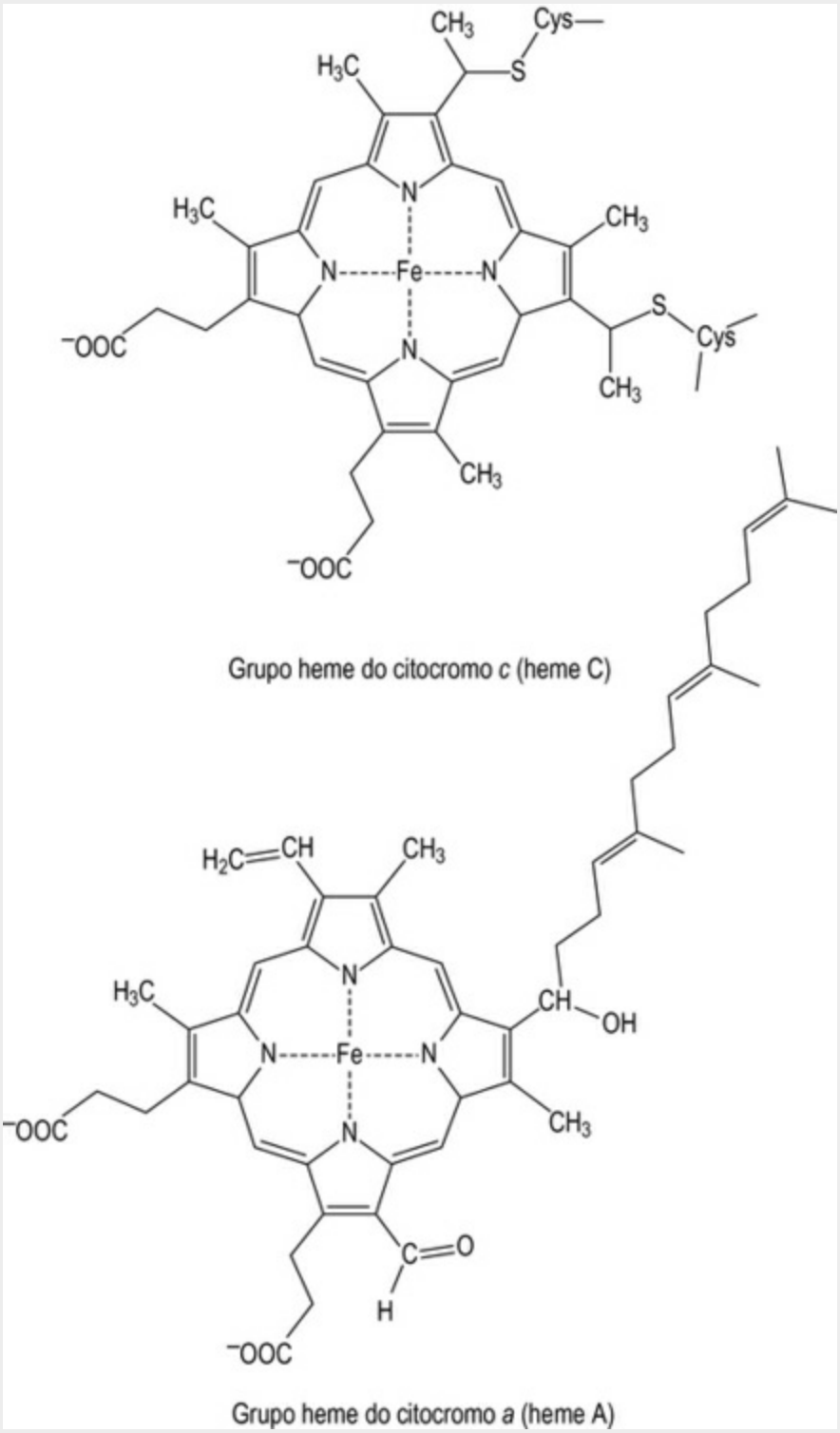


FIG. 9.9 Variações na estrutura do heme entre os citocromos.
Os citocromos são proteínas que contêm grupos heme.

Quadro clínico

Deficiência de cobre em recém-nascidos

O cobre é necessário em quantidades traço para a nutrição humana ótima. Embora a deficiência de cobre em adultos seja rara, recém-natos prematuros têm baixas reservas de cobre e podem sofrer por conta desta deficiência. Esta pode levar à anemia e cardiopatia, pois compromete a síntese de quantidades adequadas de citocromo *c* oxidase e de outras enzimas, incluindo-se várias cuproenzimas envolvidas na síntese de heme.

Comentário

A deficiência de cobre pode impedir a produção de ATP pela inibição da reação terminal da cadeia de transporte de elétrons, levando a patologias no coração, onde a demanda de energia é alta. Fórmulas dietéticas para crianças prematuras devem conter cobre em concentrações adequadas; o leite de vaca isoladamente é insuficiente, pelo fato de apresentar quantidade insuficiente de cobre.

Complexo IV

O complexo IV, no final da cadeia transportadora de elétrons, transfere elétrons para o oxigênio, produzindo água

O complexo IV, conhecido como citocromo *c* oxidase ou citocromo oxidase, existe como um dímero na MMI. Este oxida o citocromo *c* móvel, e conduz elétrons através dos citocromos *a* e a_3, finalmente reduzindo o oxigênio à água em uma reação de transferência de quatro elétrons (Fig. 9.10). O cobre é um componente comum desta e de outras enzimas. Os venenos de baixo peso molecular, como **azida, cianeto** e **monóxido de carbono**, se ligam ao grupo heme do citocromo a_3 no citocromo *c* oxidase e inibem o complexo IV. Em comum com os complexos I e III, o complexo do citocromo oxidase bombeia prótons para fora da mitocôndria, contribuindo para a síntese de cerca de uma molécula de ATP por par de elétrons transferidos para o oxigênio. O número real de prótons bombeados é quatro. Adicionalmente, outros quatro são necessários na redução de O_2 para água. A reação total catalisada pelo complexo IV é:

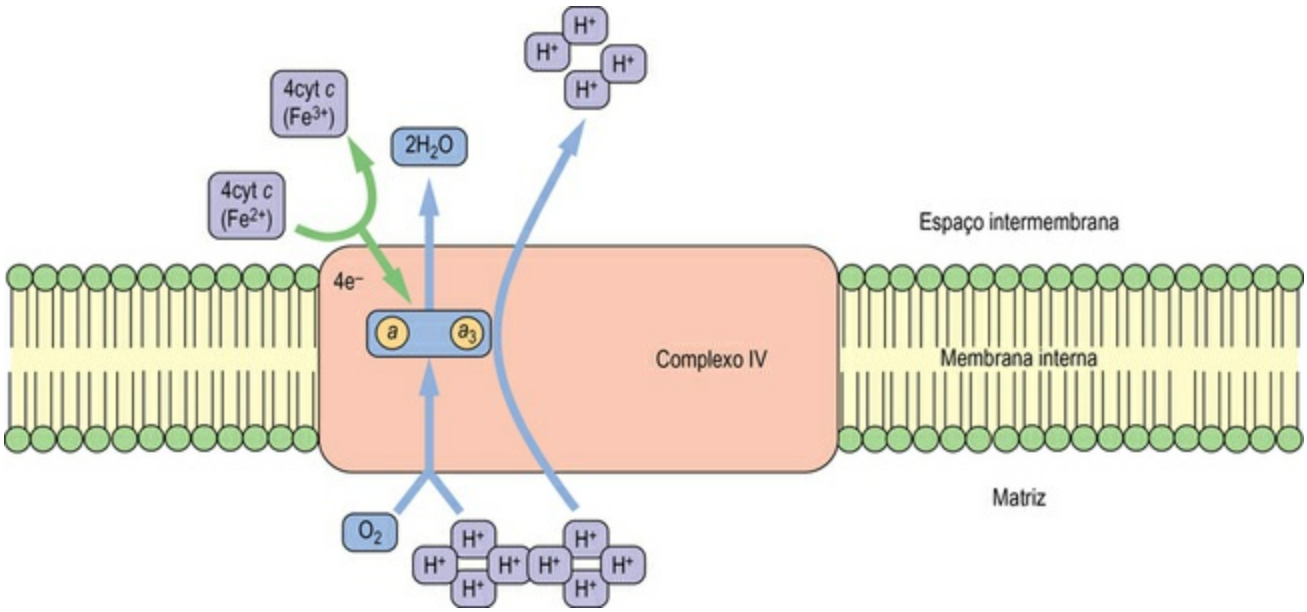


FIG. 9.10 Complexo IV.
O complexo IV utiliza quatro elétrons do citocromo *c* e oito prótons da matriz. Os quatro prótons e elétrons reduzem o oxigênio à água. Quatro prótons adicionais são bombeados para fora da matriz. O complexo IV é regulado alostericamente pelo ATP, por fosforilação/desfosforilação reversível e pelo hormônio tireoidiano (T_2 ou di-iodotironina). *a*,citocromo *a*; a_3, citocromo a_3.

$$4\text{cit c}_{\text{reduzido}} + 4\text{H}^+_{\text{(matriz)}} + \text{O}_2 \rightarrow 4\text{citc}_{\text{oxidado}} + 2\text{H}_2\text{O}$$

Síntese de adenosina trifosfato – a hipótese quimiostática

De acordo com a hipótese quimiostática, a mitocôndria produz ATP utilizando a energia livre do gradiente de prótons gerado durante a oxidação do NADH e do $FADH_2$. Esta energia é descrita como uma **força próton motriz**, um **gradiente eletroquímico** criado pelo gradiente de concentração de prótons e um desequilíbrio de carga (de positividade externa) ao longo da membrana mitocondrial interna. Para operar, é necessário um sistema na membrana interna que seja impermeável aos prótons, exceto através da ATP sintase ou outros complexos, de forma regulada. Quando os prótons são bombeados para fora da matriz, o espaço intermembranas se torna mais ácido e mais positivamente carregado que a matriz.

O complexo ATP sintase (complexo V) é um exemplo de catálise rotacional

Revestindo a face interna da matriz da membrana interna de cada mitocôndria estão milhares de cópias do complexo ATP sintase, também chamado de complexo V ou F_0F_1-ATP sintase (F = fator de acoplamento; veja inibidores da ATP sintase, adiante). A ATP sintase é também chamada de ATPase porque pode hidrolisar ATP. A ATP sintase consiste em dois complexos principais (Fig. 9.11). O componente de membrana interna, denominado F_0, é o motor impulsionado por prótons com a estequiometria de *a*, b_2 e $c_{10\text{-}14}$.

As subunidades *c* formam o anel *c*, que gira no sentido horário em resposta ao fluxo de prótons através do complexo. Desde que as subunidades γ e ε são ligadas ao anel *c*, estas giram com este, induzindo grandes mudanças conformacionais nos três dímeros αβ do complexo F_1. As duas β proteínas imobilizam o segundo complexo (F_1-ATP sintase).

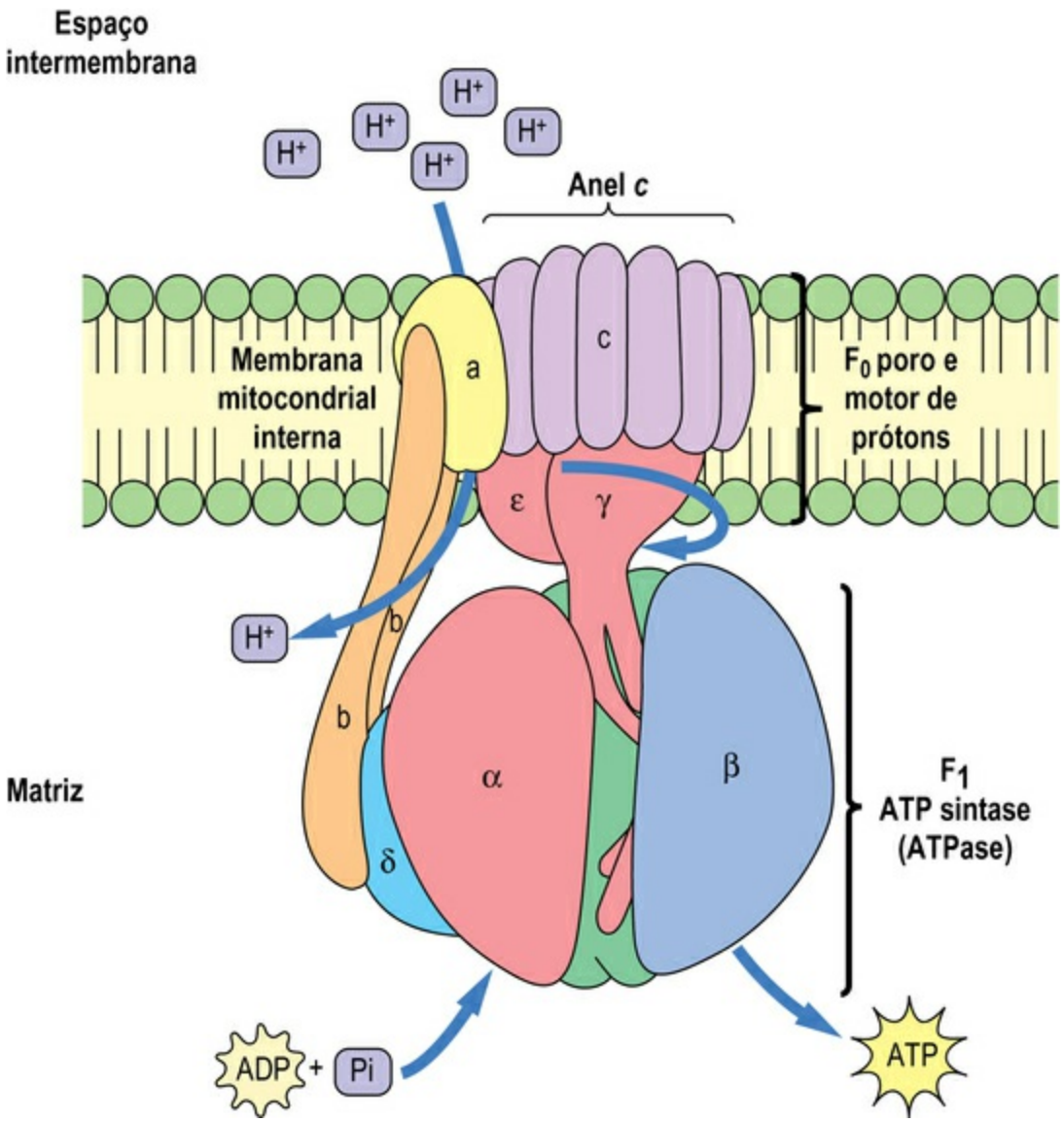


FIG. 9.11 O complexo da ATP sintase.
O complexo da ATP sintase consiste em um motor (F_0) e gerador (F_1). O poro de prótons envolve o anel *c* e a proteína *a*. O componente giratório é a subunidade γ, que é ligada à subunidade ε e ao anel *c*. O componente estacionário é a unidade hexamérica $\alpha_3\beta_3$, que é ajustada pelas proteínas δ, *b* e *a*.

F_1 tem uma estequiometria de α_3, β_3, γ, δ, ε. A maior parte de F_1 consiste em três dímeros αβ arranjados como gomos de uma laranja, com a atividade catalítica localizada na subunidade β. Cada rotação de 120° de rotação da subunidade γ induz alterações conformacionais nas subunidades de dímeros αβ, de tal forma que os locais de ligação a nucleotídios se alternam entre três estados: o primeiro liga ADP e Pi, o segundo sintetiza ATP e o terceiro libera ATP, de modo que, a cada giro completo, são produzidos três ATP. Este é conhecido como um **mecanismo de mudança de ligação** (Fig. 9.12). Surpreendentemente, a energia livre próton-motriz utilizada pela ATP sintase não é

propriamente para a síntese do ATP, mas para sua liberação; quando o gradiente de prótons é muito baixo para permitir a liberação do ATP, o ATP permanece preso à ATP sintase e cessa a síntese de ATP adicional. O ADP e o Pi são ligados ao complexo assim que o ATP for liberado. Os dímeros $\alpha\beta$ são assimétricos porque cada um está em uma configuração diferente a cada dado momento. Este complexo é um motor impulsionado por prótons e é um exemplo de catálise giratória. Cerca de três prótons são necessários para a síntese de cada ATP. Este complexo atua independentemente da cadeia de transporte de elétrons: a adição de um ácido fraco, como o ácido acético, a uma suspensão de mitocôndrias isoladas é suficiente para induzir a biossíntese de ATP *in vitro*.

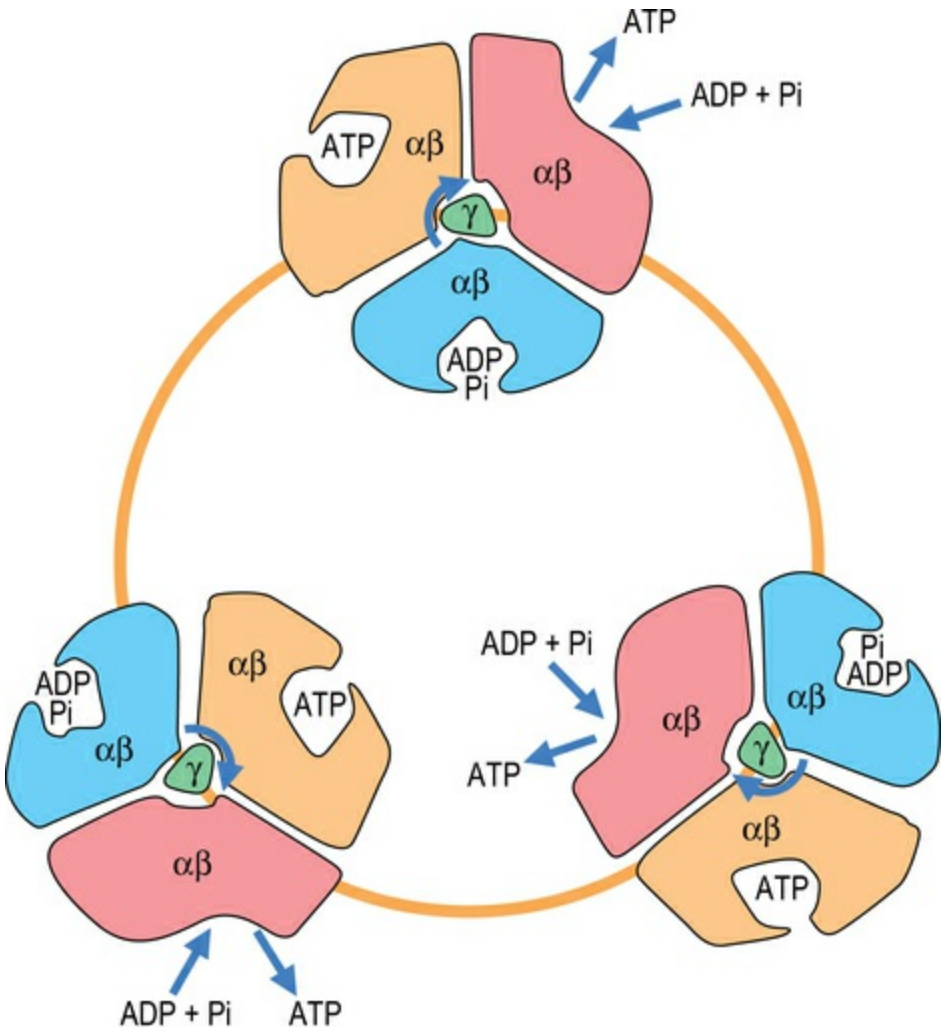


FIG. 9.12 Mecanismo de mudança de ligação da ATP sintase.
Potencializado por prótons, o giro da subunidade γ da ATP sintase induz alterações conformacionais simultâneas em todos os três dímeros αβ. Cada giro de 120° resulta em ejeção de um ATP, ligação de ADP e Pi, e síntese de ATP.

Razões P:O

A razão P:O é a medida do número de fosfatos de alta energia (ou seja, a quantidade de ATP) sintetizado por átomo de oxigênio ($\frac{1}{2}O_2$) consumido, ou por mol de água produzido. A razão P:O pode ser calculada a partir dos mol de ADP utilizados para

sintetizar ATP e os átomos de oxigênio captados pela mitocôndria. Por exemplo, se 2 mmol de ADP são convertidos a ATP e 0,5 mmol de oxigênio (1,0 miliátomo de oxigênio) é captado, a razão P:O é 2,0. Como discutido anteriormente, o rendimento teórico de ATP por mol de NADH é de cerca de 7 mol; entretanto, pela medida real utilizando-se mitocôndrias isoladas, **o índice P:O para a oxidação de metabólitos que produzem NADH é de cerca de 2,5 e a razão para aqueles que produzem $FADH_2$ é de 1,5.** O restante de energia disponível da oxidação de NADH e $FADH_2$ é liberado na forma de calor.

"O controle respiratório" é a dependência de captação de oxigênio pela mitocôndria na disponibilidade de ADP

Em geral, a oxidação e a fosforilação estão firmemente acopladas; os substratos são oxidados, elétrons são transportados, e o oxigênio é consumido somente quando a síntese de ATP é necessária (respiração acoplada). Então, a mitocôndria em repouso consome oxigênio em baixa velocidade, que pode ser grandemente estimulado pela adição de ADP (Fig. 9.13). O ADP é captado pela mitocôndria e estimula a ATP sintase, que diminui o gradiente de prótons. A respiração aumenta porque as bombas de prótons são estimuladas a restabelecer o gradiente de prótons. Quando o ADP é depletado, a síntese de ATP cessa e a respiração retorna ao nível normal. O consumo de oxigênio decresce ao nível original quando a concentração de ADP é depletada e a síntese de ATP termina.

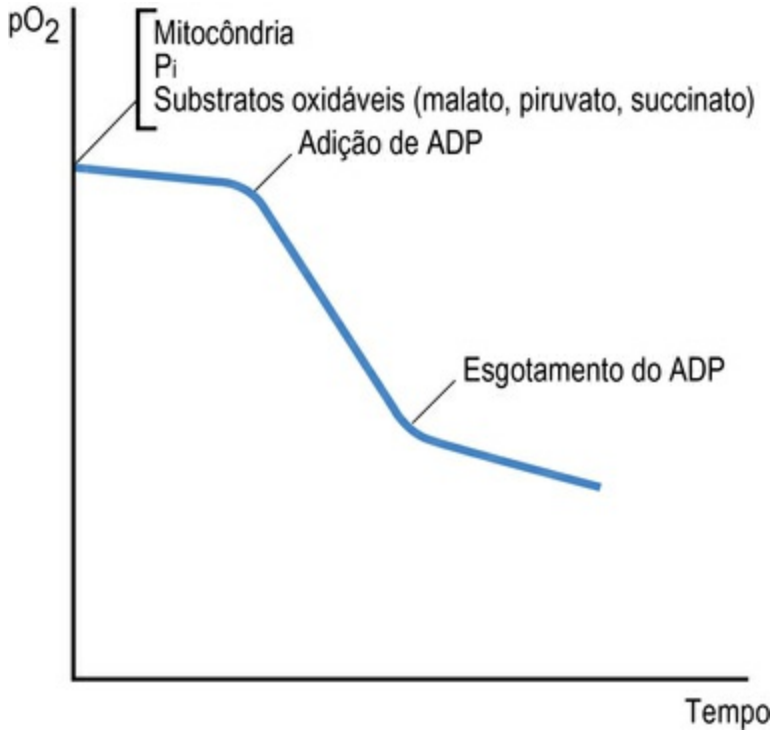


FIG. 9.13 Efeito do ADP na captação de oxigênio por mitocôndrias isoladas.
Isto pode ser estudado em sistemas isolados (selados) com um eletrodo de oxigênio e um dispositivo de registro. O gráfico mostra um registro típico de consumo de oxigênio (pO_2, pressão parcial de oxigênio) por mitocôndrias normais com a introdução de ADP.

A mitocôndria pode ser parcialmente desacoplada se a membrana interna perder sua integridade. Diz-se estarem "vazadas", porque os prótons podem se difundir através da membrana interna sem envolver a ATP sintase. Isso ocorre se mitocôndrias isoladas são tratadas ou mantidas durante determinado tempo com detergentes fracos que rompem a membrana interna. Tais mitocôndrias são denominadas "desacopladas"; a oxidação progride sem a produção de ATP, e as mitocôndrias desacopladas perdem o controle respiratório porque os prótons bombeados pela cadeia respiratória escapam da ATPase e são devolvidos improdutivamente de volta ao interior da matriz. A razão P:O decresce sob tais condições.

O mecanismo de controle da respiração depende da ligação de ADP e de Pi ao complexo de ATP sintase: na ausência de ADP e de Pi, os prótons não podem entrar na mitocôndria através desse complexo, e o consumo de oxigênio decresce acentuadamente porque as bombas de prótons não podem bombear prótons contra uma alta pressão de prótons contrária. Isso ocorre porque a energia livre das reações de transporte de elétrons é suficiente para gerar um gradiente de pH de duas unidades através da membrana. Se o gradiente de pH não pode ser desfeito para a produção de ATP, o gradiente de duas unidades de pH se mantém, e a bomba vai parando gradualmente até a interrupção total. A cadeia transportadora de elétrons torna-se reduzida e diminui a oxidação de substratos e o consumo de oxigênio. Uma pequena atividade física, com consumo de ATP e geração de ADP e de Pi, restaura os canais de ATPase, desfazendo o gradiente de prótons e ativando a cadeia de transporte de elétrons, o consumo de combustível e oxigênio. No corpo como um todo, respira-se mais rapidamente durante o exercício para fornecer o oxigênio necessário para um aumento da fosforilação oxidativa.

Desacopladores

Os desacopladores e as proteínas desacopladoras são termogênicos

Os desacopladores da fosforilação oxidativa dissipam o gradiente de prótons pelo transporte retrógrado destes prótons de volta para o interior da mitocôndria, sem passar pela ATP sintase. Os desacopladores estimulam a respiração porque o sistema realiza uma inútil tentativa de restabelecer o gradiente de prótons pela oxidação de mais combustível e bombeando mais prótons para fora da mitocôndria. **Os desacopladores são geralmente compostos hidrofóbicos e também ácidos ou bases fracas, com pK_a próximo ao pH 7.** O clássico desacoplador, 2-4-dinitrofenol (DNP) (Fig. 9.14), é protonado no lado externo, mais ácido, da membrana mitocondrial interna. Em virtude de sua hidrofobicidade, ele pode se difundir livremente através da membrana mitocondrial interna. Quando atinge o lado da matriz, encontra um pH mais básico e o próton é liberado, desfavorecendo o gradiente de pH efetivamente. Outros desacopladores incluem preservantes e agentes antimicrobianos, tais como pentaclorofenol e *p*-cresol.

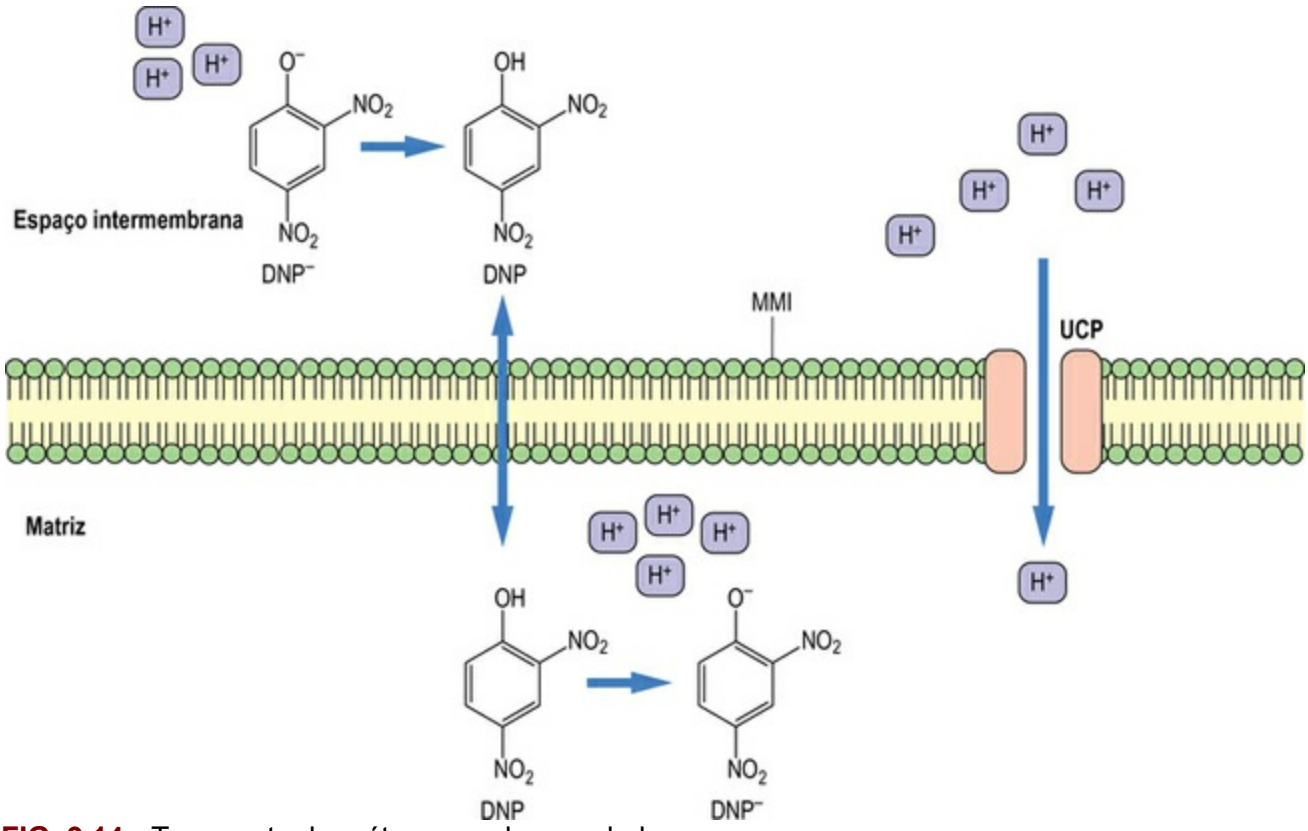


FIG. 9.14 Transporte de prótons por desacopladores.
Os desacopladores transportam prótons para o interior da mitocôndria, dissipando o gradiente de prótons. O DNP é exemplo de desacoplador exógeno. As proteínas desacopladoras (UCP) são desacopladores endógenos na MMI e são regulados por hormônios. O gradiente consistindo em prótons e de outros fatores constitui o potencial mitocondrial de membrana (PMM), que é expresso em milivolts (mV). DNP, 2,4-dinitrofenol; MMI, membrana mitocondrial interna.

Proteínas desacopladoras (UCP)

De acordo com a hipótese quimiostática, a membrana mitocondrial interna é topologicamente fechada. Entretanto, já há muito tempo se sabe que os prótons são transportados para dentro da matriz a partir do espaço intermembrana por outras vias que não o complexo da ATP sintase e transportadores de membrana interna. Atualmente, considera-se que grande parte do BMR é principalmente devido a componentes de membrana interna chamados de proteínas desacopladoras (UCP). A primeira a ser descoberta foi a proteína desacopladora 1 (UCP-1), anteriormente conhecida como **termogenina,** que é encontrada exclusivamente no tecido adiposo marrom. O **tecido adiposo marrom** é abundante em recém-natos e em alguns mamíferos adultos e é marrom por seu alto conteúdo de mitocôndrias. Nos humanos, o tecido adiposo marrom é abundante em lactentes, mas gradualmente diminui e é raramente detectado em adultos. A única função da UCP-1 é o fornecimento de calor durante o estresse do frio em animais jovens e em alguns adultos. Isto se realiza pelo desacoplamento do gradiente de prótons, produzindo assim calor (termogênese) em vez de ATP. As proteínas desacopladoras são expressas em altos níveis em animais que hibernam, permitindo-os manter a temperatura corporal sem movimento ou exercício.

Quatro outras proteínas desacopladoras são expressas a partir do genoma humano: UCP-2, UCP-3, UCP-4 e UCP-5. Enquanto a UCP-1 é exclusiva de tecido adiposo marrom, a

expressão de UCP-2 é de caráter ubíquo, e a UCP-3 é principalmente expressa no músculo esquelético, e a UCP-4 e a UCP-5 são expressas no cérebro. Exceto para a UCP-1, as funções fisiológicas dessas proteínas não estão completamente esclarecidas, mas podem ser de alto significado na nossa compreensão das questões de saúde, tais como diabetes, obesidade, câncer, doenças da tireoide e envelhecimento. Como desacopladoras, elas têm sido relacionadas com numerosas funções fundamentais. Por exemplo, há forte evidência de que a obesidade induz a síntese de UCP-2 em células β do pâncreas. Isso pode ter um papel na disfunção das células β encontradas no diabetes tipo 2, uma vez que ela diminui a concentração intracelular de ATP, que é necessária para a secreção de insulina. Mostrou-se que o hormônio tireoidiano (T_3) estimula a termogênese em ratos promovendo a síntese de UCP-3 em músculo esquelético. É provável que a febre que é induzida por organismos infectantes seja decorrente do desacoplamento por UCPs, mas o mecanismo é desconhecido.

Inibidores do metabolismo oxidativo

Inibidores do sistema de transporte de elétrons

Os inibidores do transporte de elétrons inibem seletivamente os complexos I, III ou IV, interrompendo o fluxo de elétrons através da cadeia respiratória. Isso impede o bombeamento de elétrons, a síntese de ATP e a captação de oxigênio. Vários inibidores são venenos facilmente disponíveis que podem ser encontrados na prática médica. É digno de nota que defeitos genéticos de componentes da cadeia de elétrons podem mimetizar o efeito desses inibidores.

Rotenona inibe o complexo I (NADH-Q redutase)

A rotenona, um inseticida comum, e alguns barbitúricos (p. ex., o amital) inibem o complexo I. Já que o malato e o lactato são oxidados pelo NAD^+, a oxidação destes será diminuída pela rotenona. Entretanto, os substratos que produzem $FADH_2$ podem, ainda, ser oxidados, visto que o complexo I é ignorado e os elétrons são doados à ubiquinona de $FADH_2$. A adição de ADP a uma suspensão de mitocôndrias suplementadas com malato e fosfato (Fig. 9.15) estimula acentuadamente a captação de oxigênio à medida que ocorre a síntese de ATP. A captação de oxigênio é acentuadamente inibida pela rotenona, mas quando succinato é adicionado, a síntese de ATP e o consumo de oxigênio são restaurados até que o suprimento de ADP seja exaurido. A inibição do complexo I pela rotenona causa a redução de todos os componentes anteriores ao ponto de inibição, porque estes não podem ser oxidados, enquanto aqueles após o ponto de inibição são totalmente oxidados. Este ponto é conhecido como uma encruzilhada e pode ser determinado espectofotometricamente porque a luz absorvida pelos componentes da cadeia respiratória muda de acordo com o estado redox. Tais análises foram empregadas para definir a sequência de componentes na cadeia respiratória.

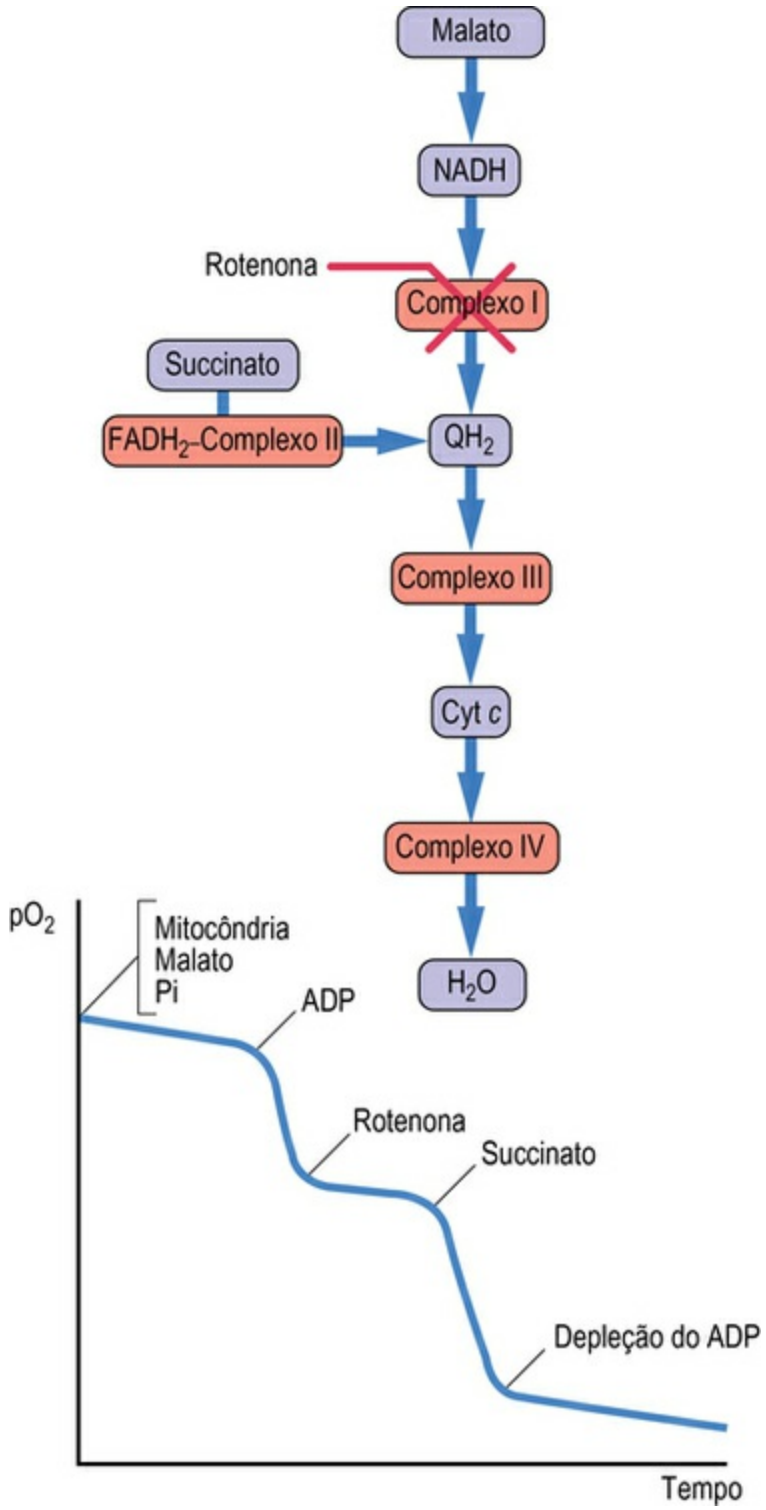


FIG. 9.15 Inibição do complexo I.
Inibidores como a rotenona retardam a captação de oxigênio pela mitocôndria quando substratos produtores de NADH vão sendo oxidados.

Antimicina A inibe o complexo III (QH_2-citocromo c redutase)

A inibição do complexo III pela antimicina A previne a transferência, tanto do complexo I quanto das flavoproteínas contendo $FADH_2$ para o citocromo *c*. Nesse caso, os componentes anteriores ao complexo III se tornam totalmente reduzidos e os posteriores a este se tornam oxidados. A curva de captação de oxigênio (Fig. 9.16) mostra que a estimulação da respiração pelo ADP é inibida pela antimicina A, mas que a adição de succinato não reverte a inibição. O ácido ascórbico pode reduzir o citocromo *c*, e a adição

de ácido ascórbico restabelece a respiração, ilustrando que o complexo IV não é afetado pela antimicina A.

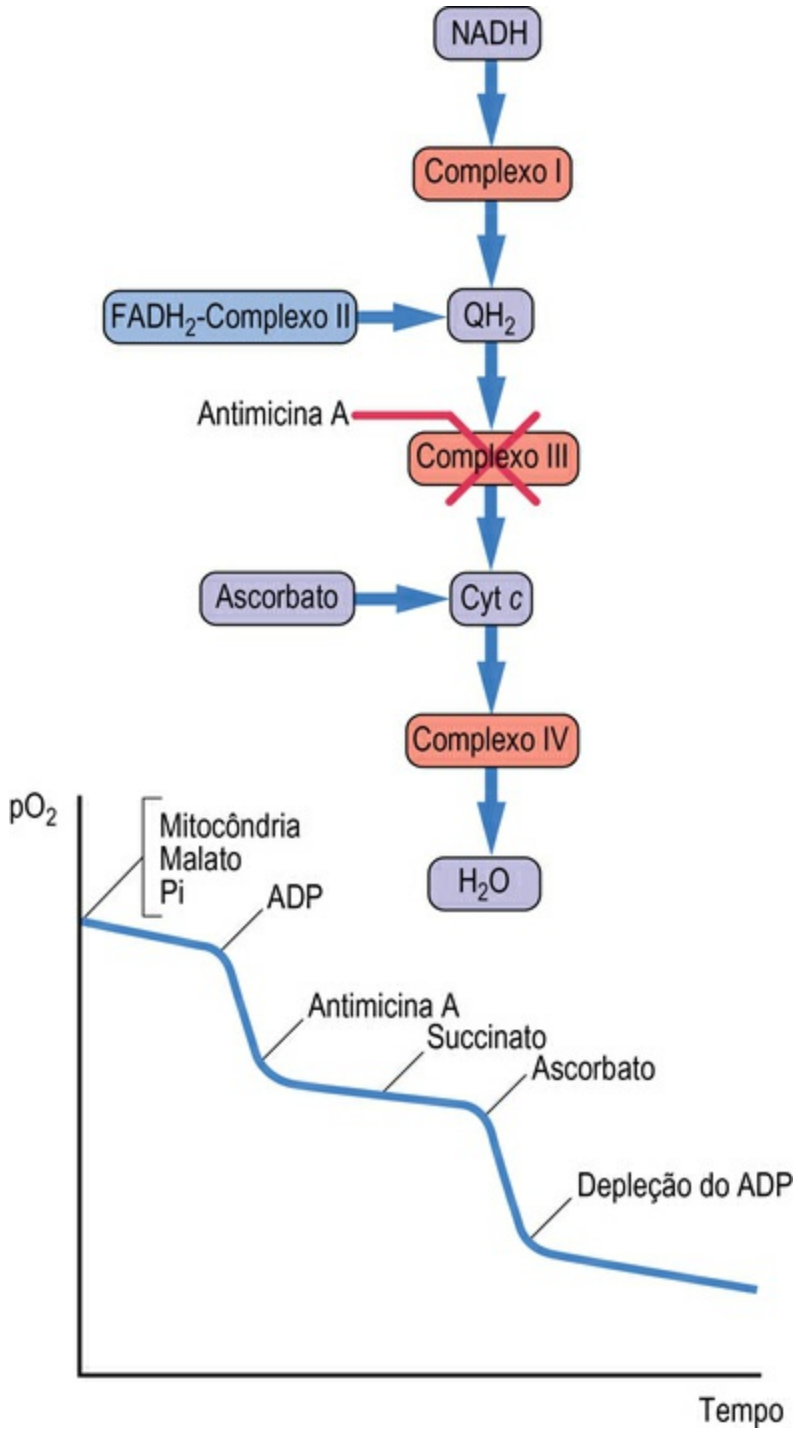


FIG. 9.16 Inibição do complexo III pela antimicina.
A antimicina A inibe o complexo III, bloqueando a transferência de elétrons, tanto do complexo I e das flavoproteínas quanto do complexo II.

Cianeto e monóxido de carbono inibem o complexo IV

A azida (N_3^-), o cianeto (CN^-) e o monóxido de carbono (CO) inibem o complexo IV (citocromo *c* oxidase) (Fig. 9.17). Como o complexo IV é o complexo terminal de transferência de elétrons, sua inibição não pode ser desviada. Todos os componentes anteriores ao complexo IV se tornam reduzidos, o oxigênio não pode ser reduzido,

nenhum dos complexos pode bombear prótons e o ATP não é sintetizado. Os desacopladores como o DNP não têm efeito porque não há nenhum gradiente de prótons. O cianeto e o monóxido de carbono também se ligam à hemoglobina, bloqueando a ligação e o transporte do oxigênio (Cap. 5). Nesses envenenamentos, estão prejudicados tanto a capacidade de transporte de oxigênio quanto a síntese de ATP. A administração de oxigênio é empregada para o tratamento de tais envenenamentos. É interessante que a azida sódica é a fonte de nitrogênio para *air bags* serem inflados; se esta for liberada acidentalmente, pode trazer um problema ambiental, ou seja, não por explosão.

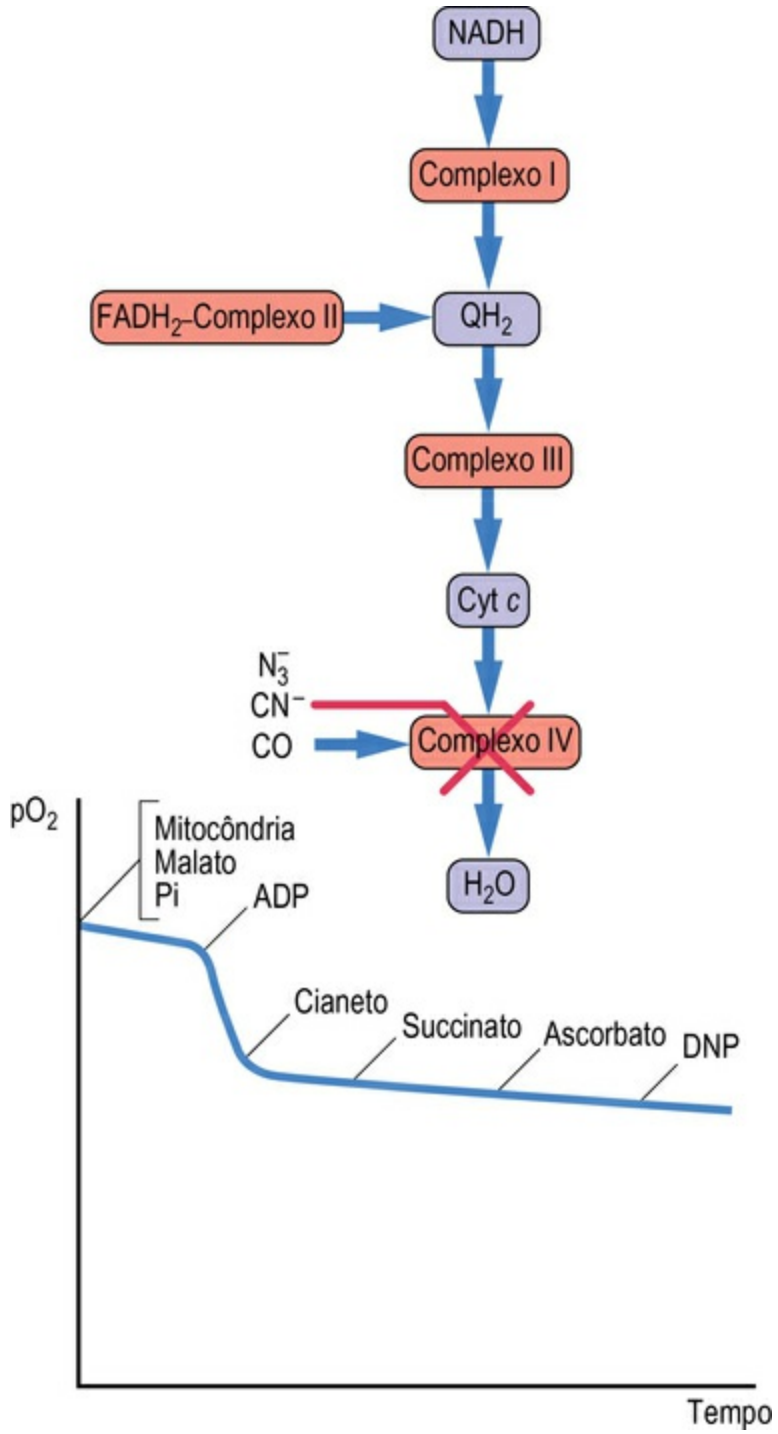


FIG. 9.17 Inibição do complexo IV.
A inibição do complexo IV interrompe a transferência de elétrons, na etapa final do transporte de elétrons. Os elétrons não podem ser transferidos para o oxigênio, e a síntese de ATP é interrompida.

Oligomicina inibe a ATP sintase

A oligomicina inibe a respiração, mas, em contraste com os inibidores de transporte de elétrons, não é um inibidor direto do sistema de transporte de elétrons. Em vez disso, esta inibe o canal de prótons da ATP sintase. Isto causa o acúmulo de prótons fora da mitocôndria, uma vez que o sistema de bombeamento de prótons está ainda intacto, mas o canal de prótons está bloqueado. A adição do desacoplador DNP, após a captação de oxigênio tendo sido inibida pela oligomicina, ilustra este ponto: o DNP dissipa o gradiente de prótons e estimula a captação de oxigênio à medida que o sistema de

transporte de elétrons tenta restabelecer o gradiente de prótons (Fig. 9.18).

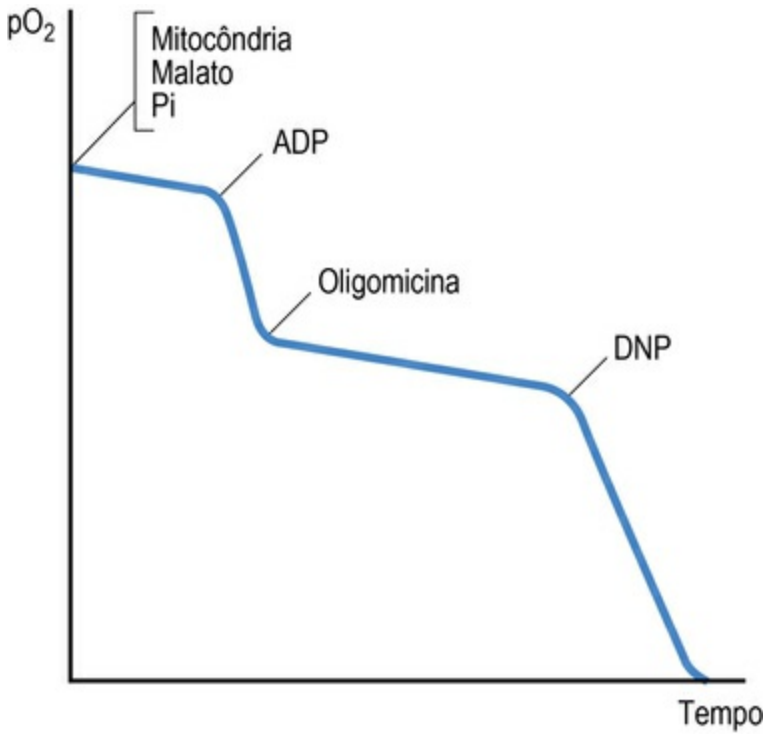


FIG. 9.18 Oligomicina inibe a captação de oxigênio.
A oligomicina inibe a captação de oxigênio na síntese mitocondrial de ATP. A oligomicina inibe a ATP sintase e a captação de oxigênio em mitocôndria acoplada. No entanto, o DNP estimula a captação de oxigênio após a inibição pela oligomicina, por desfazer o gradiente de prótons.

Inibidores da ADP-ATP translocase

A maioria do ATP é sintetizada na mitocôndria, mas utilizada no citosol para reações de síntese. O ATP recém-sintetizado na mitocôndria e o ADP citosólico gasto são trocados por uma ADP-ATP translocase, representando cerca de 10% da proteína no interior da membrana mitocondrial interna (Fig. 9.3). Esta translocase pode ser inibida por plantas incomuns e por toxinas de fungos, como o **ácido bongkréquico e atractilosídio**. Seus efeitos são similares aos da oligomicina *in vitro* – o gradiente de prótons aumenta e o transporte de elétrons cessa; no entanto, assim como para oligomicina, a respiração pode ser reativada por desacopladores.

Regulação da fosforilação oxidativa

Controle respiratório e regulação por retroalimentação

O ADP é o regulador por retroalimentação chave da fosforilação oxidativa

O mais antigo e mais simples mecanismo de regulação de controle respiratório é realizado pelo suprimento de ADP. Este é fundamentado no fato de que o ADP, quando adicionado a mitocôndrias isoladas, estimula a respiração e a síntese de ATP. Quando o ADP é totalmente convertido em ATP, a respiração retorna à velocidade inicial. A

fosforilação oxidativa está também firmemente acoplada a outras vias fundamentais, tais como glicólise, oxidação de ácidos graxos e ao ciclo dos ácidos tricarboxílicos (Caps. 12, 14 e 15) através de mecanismos de retroalimentação. As proporções NADH/NAD e ATP/ADP retroalimentam enzimas-chave, tais como PKF-1, piruvato desidrogenase e isocitrato desidrogenase. Se, por exemplo, a fosforilação oxidativa for desativada por conta de alta concentração de ATP, tanto o NADH quanto o ATP serão retroalimentados negativamente em outras vias extramitocondriais, limitando o fluxo de combustível para a mitocôndria. Uma vez que a fosforilação oxidativa depende da oferta de $FADH_2$, NADH, ADP e Pi, assim como a razão ATP/ADP, a magnitude do potencial de membrana, desacopladores e fatores hormonais, seu modo de regulação é evidentemente complexo.

Regulação por modificação covalente e efetores alostéricos (ATP-ADP)

O principal alvo para a regulação da fosforilação oxidativa parece ser o complexo IV. Este é fosforilado em resposta à ação hormonal (Cap. 13) pela proteína cinase dependente de monofosfato cíclico de 3'5'-adenosina (cAMP) e desfosforilado por uma proteína fosfatase estimulada por Ca^{2+}. A fosforilação favorece a regulação alostérica por ATP (razão ATP/ADP). Uma alta relação ATP/ADP inibe e uma relação baixa estimula a fosforilação oxidativa. Pensa-se que o complexo está normalmente fosforilado e inibido por ATP. Com níveis elevados de Ca^{2+}, ou seja, no músculo durante o exercício (Cap. 20), a enzima é desfosforilada, fica abolida a inibição por ATP/ADP e sua atividade é grandemente estimulada, elevando-se a produção de ATP.

Com base na observação de que no diabetes tipo 2 a produção de ATP está diminuída quando a subunidade β de ATP sintase é fosforilada, foi proposto que este complexo seja também regulado por fosforilação/desfosforilação. Note que a secreção de insulina nas células β do pâncreas depende de ATP, visto que este se liga ao canal de potássio sensível ao ATP (leia sobre secreção de insulina no Capítulo 21).

Regulação por hormônios tireoidianos

Os hormônios tireoidianos atuam em dois níveis na mitocôndria. Em ratos, o T_3 estimula a síntese de UCP-2 e de UCP-3, que podem desacoplar o gradiente de prótons, mas isto não foi documentado em humanos. Adicionalmente, T_2 se liga ao complexo IV no lado da matriz, induzindo engano na citocromo oxidase *c*. O termo "engano" significa que o complexo IV bombeia menos prótons por elétron transportado através do complexo, resultando em termogênese. As ações de T_3 e T_2 podem explicar, em parte, a longo e curto prazo, respectivamente, os efeitos termogênicos dos hormônios tireoidianos (Cap. 39).

Poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM)

Localizado na membrana mitocondrial interna, o PTPM é um poro não seletivo que

constitui um fator crítico para a morte celular. Encontra-se normalmente fechado, mas abre quando as células são reperfundidas após um período de isquemia (**lesão de isquemia-reperfusão, IR,** Cap. 37), e pequenas moléculas abandonarão a matriz mitocondrial. Atualmente, a abertura do PTPM é considerada uma característica-chave da IR, na qual o dano celular é muito superior ao produzido somente pela isquemia. As cascatas de reações que ocorrem em resposta à IR levam à apoptose e necrose, e à morte celular.

A isquemia, como a que se verifica em ataques cardíacos, é normalmente causada por um coágulo que bloqueia uma artéria. Fibrinolíticos como a estreptocinase podem ser administrados para dissolver os coágulos e reperfundir as células isquêmicas. Contudo, se o estado de isquemia tiver sido prolongado previamente à administração de um fibrinolítico, a morte pode resultar do dano de reperfusão e da abertura do PTPM. Este evento ocorre muito frequentemente em vítimas de ataque cardíaco. Vários fármacos, como a ciclosporina A, inibem a abertura do PTPM e podem proteger as células da necrose ou apoptose após a administração de um fibrinolítico. De fato, um estudo clínico alargado da ciclosporina A está presentemente sendo conduzido com vítimas de ataque cardíaco, em conjugação com a administração de um fibrinolítico.

Resumo

- O sistema de transporte de elétrons consiste em carreadores de elétrons que estão localizados na membrana mitocondrial interna, cada um dos quais sendo isolado como complexo ou como molécula única.
- Os elétrons das quatro principais flavoproteínas alimentam com elétrons a ubiquinona, o primeiro membro da via comum. A energia derivada da condução de elétrons através do sistema de transporte de elétrons é utilizada por três dos complexos para bombear prótons para dentro do espaço intermembrana, estabelecendo o gradiente eletroquímico ou força próton-motriz.
- O gradiente de prótons é utilizado para capacitar a ATP sintase na síntese de ATP pela catálise giratória, assim como o transporte de intermediários através da membrana interna.
- Numerosas toxinas podem prejudicar gravemente o sistema de transporte de elétrons, a ATP sintase e a translocase que troca ATP e ADP através da membrana mitocondrial interna.
- A velocidade de produção de ATP pelo sistema de transporte de elétrons é regulada pela modulação do gradiente de prótons, por modificações alostéricas, por fosforilação-desfosforilação e por hormônios tireoidianos.
- Pelo menos cinco proteínas desacopladoras (UCPs) com distribuições em tecidos específicos localizam-se na membrana mitocondrial interna, e estas regulam os potenciais de membrana, o gasto de energia e a termogênese.
- Doenças ou condições crônicas, tais como diabetes, câncer, obesidade e envelhecimento, estão todas ligadas à desregulação da fosforilação oxidativa através do efeito sobre o sistema de transporte de elétrons e sobre a ATP sintase.

- A integridade da mitocôndria e das células pode ser perturbada pela lesão de isquemia-reperfusão e pela abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial, causando morte e dano nos tecidos.

Leituras sugeridas

Cao, X. H., Zhao, S. S., Liu, D. Y., et al. ROS-Ca(2+) is associated with mitochondria permeability transition pore involved in surfactin-induced MCF-7 cells apoptosis. *Chem Biol Interact*. 2011; 190:16–27.

Picard, M., Taivassalo, T., Gouspillou, G., et al. Mitochondria: isolation, structure and function. *J Physiol*. 2011; 589:4413–4421.

Pinadda, V., Halestrap, A. P. The roles of phosphate and the phosphate carrier in the mitochondrial permeability transition pore. *Mitochondrion*. 2012; 12:120–125.

Ramsden, D. B., Ho, P. W., Ho, J. W., et al. Human neuronal uncoupling proteins 4 and 5 (UCP4 and UCP5): structural properties, regulation, and physiological role in protection against oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Brain Behav*. 2012; 2:468–478.

Ruiz-Meana, M., Fernandez-Sanz, C., Garcia-Dorado, D. The SR-mitochondria interaction: a new player in cardiac pathophysiology. *Cardiovasc Res*. 2010; 88:30–39.

Shanbhag, R., Shi, G., Rujiviphat, J., et al. The emerging role of proteolysis in mitochondrial quality control and the etiology of Parkinson's disease. *Parkinsons Dis*. 2012; 2012:382175.

Vonck, J., Schäfer, E. Supramolecular organization of protein complexes in the mitochondrial inner membrane. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1793:117–124.

Wang, W. H., Chiang, I. T., Ding, K., et al. Curcumin-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma j5 cells: critical role of Ca(2+)-dependent pathway. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012; 2012:512907.

Sites

Filmes sobre a ATP sintase

www.cnr.berkeley.edu/~hongwang/Project/ATP_synthase/.

www.youtube.com/watch?v(PjdPTY1wHdQ.

ATP synthase: http://vcell.ndsu.nodak.edu/animations/atpgradient/index.htm.

Virtual Cell Animation Center: http://vcell.ndsu.nodak.edu/animations/home.htm.

Bioenergetics: www.bmb.leeds.ac.uk/illingworth/oxphos/.

The Children's Mitochondrial Disease Network: www.emdn-mitonet.co.uk/.

United Mitochondrial disease Foundation: www.umdf.org/mitodisease/.

CAPÍTULO 10

Digestão e Absorção de Nutrientes: o Trato Gastrintestinal

Marek H. Dominiczak, Matthew Priest, Utkarsh V. Kulkarni and John I. Broom

Objetivos

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever as principais etapas da digestão.
- Discutir mecanismos envolvidos na absorção de nutrientes a partir do trato digestivo.
- Discutir o papel das enzimas digestivas.
- Discutir a digestão das principais classes de nutrientes: carboidratos, proteínas e gorduras.
- Identificar compostos resultantes da digestão de carboidratos, proteínas e gorduras que se tornam substratos para metabolismo posterior.

Introdução

O trato gastrintestinal e os órgãos funcionalmente associados a ele são responsáveis pela digestão e absorção de alimentos

Todos os organismos requerem fontes de energia e outros materiais que possibilitem a função e o crescimento. Sua sobrevivência depende da capacidade de extrair e assimilar esses recursos a partir dos alimentos ingeridos. Da mesma maneira, o epitélio intestinal e as *tight junctions* entre os enterócitos formam a barreira mais importante entre o organismo e seu ambiente externo. A barreira apresenta funções de absorção seletiva e de secreção e pode também se tornar um cenário de resposta imune (ou autoimune).

O trato gastrintestinal (GI) e os órgãos funcionalmente associados a ele, principalmente o fígado e o pâncreas, são responsáveis pela digestão e absorção dos alimentos. A digestão é o processo pelo qual os alimentos são decompostos em componentes simples o suficiente para serem absorvidos no intestino. A absorção é a

captação dos produtos da digestão pelas células intestinais (enterócitos) e sua distribuição pelo sangue ou linfa. A digestão e a absorção dos nutrientes estão estreitamente relacionadas e são reguladas pelo sistema nervoso, por hormônios e por fatores parácrinos. A presença física de partículas de alimento no trato GI também estimula estes processos.

Um aspecto importante é que a absorção e a secreção de íons como sódio, cloreto de potássio, bicarbonato e absorção de água são também funções essenciais do trato gastrintestinal. Assim, muitos problemas clínicos associados à digestão e absorção são estreitamente relacionados com distúrbios de fluidos e eletrólitos (Cap. 24). Seria um erro ver estes dois campos como separados: um clínico deve vê-los de modo integrado.

Deficiências da digestão e absorção resultam em síndromes de má digestão e má absorção, respectivamente. A **má digestão** denota o comprometimento da decomposição de nutrientes em seus produtos absorvíveis. A **má absorção** consiste em absorção, captação e transporte defeituosos dos produtos dos nutrientes que foram adequadamente digeridos.

Os sinais clínicos-chave de má absorção e/ou má digestão são diarreia, esteatorreia e perda de peso. Em crianças, o desenvolvimento está comprometido. Enquanto a diarreia aguda acarreta o risco de rápida desidratação e depleção de eletrólitos, a diarreia crônica está associada à má nutrição progressiva. Mundialmente, a doença diarreica é, de acordo com os dados da OMS (2011), a quinta principal causa de morte. A má absorção e a má digestão podem também se desenvolver como consequências de intervenção cirúrgica, como a gastrectomia, ressecção do intestino delgado ou colectomia.

A função global do trato GI é a de decompor os alimentos em componentes que possam ser absorvidos e utilizados pelo corpo (Fig. 10.1) e, em seguida, excretar o material não absorvível. Seus diferentes segmentos anatômicos apresentam funções específicas no que diz respeito à digestão e à absorção:

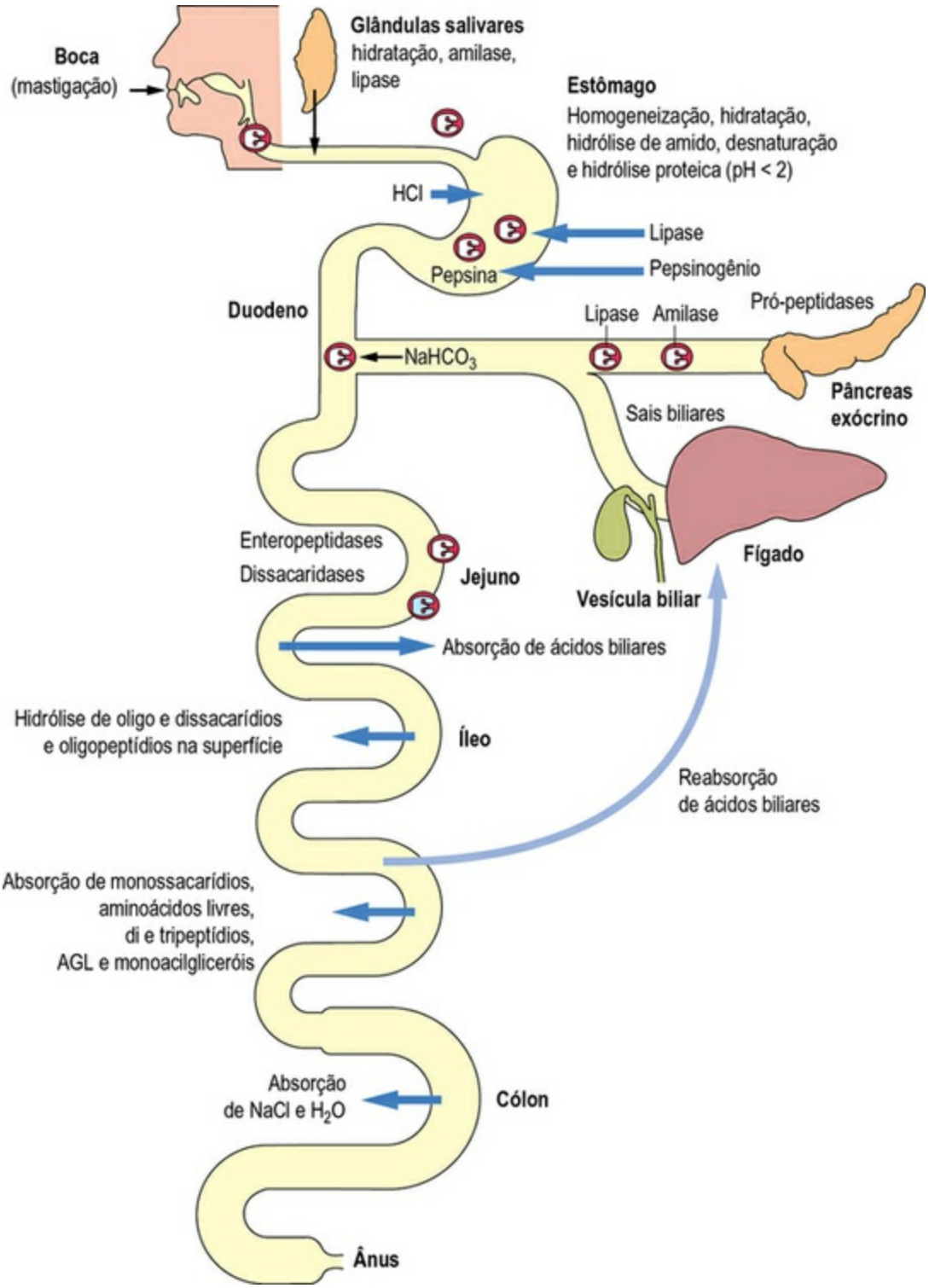


FIG. 10.1 O trato gastrintestinal (GI).
A digestão e a absorção de nutrientes requerem a função integrada de vários órgãos. A mistura de alimentos e o início da digestão ocorrem no estômago. Os processos absortivos começam no jejuno; contudo, a maior parte dos nutrientes é absorvida no íleo. O intestino grosso está envolvido na absorção de água e eletrólitos, e participa da recirculação de ácidos biliares para o fígado (Cap. 30). Levando em consideração toda a ingestão e secreções, uma grande quantidade de fluido (aproximadamente 10 L) passa através do trato GI por dia. AGL, ácidos graxos livres. Reproduzido a partir de Dominiczak MH. Medical Biochemistry Flash Cards. London: Elsevier, 2012, Card 34.

- A boca, o estômago e o duodeno se encarregam dos processos iniciais de misturar os alimentos ingeridos e iniciar a digestão
- No duodeno, a bile e as secreções pancreáticas entram através do ducto biliar comum
- O intestino delgado é a principal área digestiva: no jejuno, continuam os processos digestivos e começa a absorção; esta continua no íleo

- O intestino grosso (ceco, cólon e reto; primariamente o cólon) está envolvido na absorção e secreção de eletrólitos e água.

Processamento de água e de eletrólitos no trato gastrintestinal

O processamento de eletrólitos e de água pelo trato GI é uma de suas principais funções

O processamento de eletrólitos e de água pelo trato GI é uma de suas principais funções e inclui não apenas a absorção e secreção destes, mas também a manutenção do volume celular, e afeta a proliferação e diferenciação celulares, assim como a apoptose e a carcinogênese.

Um elevado volume de fluido é secretado e reabsorvido pelo trato GI

Em um período de 24 horas, cerca de 10 L de fluido entram e saem do trato GI. Um litro de saliva é secretado por dia; esta contém eletrólitos, proteínas e muco. As secreções intestinais totalizam cerca de 7 L todos os dias, além da ingestão média de água de cerca de 2 L. A maioria deste fluido é reabsorvida pelo intestino delgado. O cólon é particularmente ativo na reabsorção: ele absorve cerca de 90% do fluido que o atravessa, e apenas cerca de 150-250 mL de água constituem normalmente as fezes.

Os eletrólitos são secretados pelas glândulas salivares, estômago e pâncreas

Vários processos secretores ocorrem no trato GI. As glândulas salivares, o estômago e o pâncreas secretam enzimas digestivas sob a forma de zimogênios inativos. Existe secreção de íon hidrogênio no estômago. A secreção do íon bicarbonato ocorre ao longo do trato GI, sendo secretadas quantidades particularmente elevadas no suco pancreático. A secreção de potássio ocorre predominantemente no cólon e é regulada pela aldosterona.

Uma função intestinal comprometida leva a distúrbios fluido-eletrólito e ácido-base

Tudo isso apresenta implicações clínicas: doenças do trato GI e a remoção cirúrgica de grandes segmentos dos intestinos delgado e grosso acarretam o risco dos principais distúrbios de água e eletrólitos. Antes de ser conhecido o tratamento para a cólera, uma pessoa com diarreia fulminante causada pela infecção por *Vibrio cholerae* poderia morrer de desidratação em poucas horas. A acidose devido à perda de bicarbonato pode também ser uma característica da doença intestinal (Cap. 25).



Quadro clínico

Causas de perda de fluidos e eletrólitos do trato gastrintestinal

O **vômito** prolongado causa a perda direta de água, íons hidrogênio e cloreto, e posteriormente a perda de potássio devido a mecanismos de compensação do organismo. A **diarreia** pode ser causada pelo aumento de secreção intestinal em decorrência, por exemplo, de inflamação, ou pode ser causada por má absorção de nutrientes. A diarreia grave, acarretando perda de grande quantidade do conteúdo alcalino intestinal, pode levar à desidratação e acidose metabólica. Também resulta em perda de sódio, potássio e outros minerais (Caps. 11, 23 e 24). Pacientes com síndrome de intestino curto resultante de resseção extensa do intestino delgado podem desenvolver problemas graves de balanço de fluidos devido à incapacidade de reabsorverem água.

Mecanismos de transporte de água e eletrólitos no intestino

A ATPase de sódio-potássio é a força motriz para os processos de transporte nos enterócitos

Os enterócitos apresentam um conjunto de transportadores e canais de íons (Fig. 10.2). A ATPase de sódio-potássio, descrita em mais detalhe no Capítulo 24, está localizada na membrana basolateral (o "lado do sangue") e transporta o íon sódio para fora da célula, na troca com o potássio (3 íons Na^+ por cada 2 íons K^+). Isso cria um gradiente de concentração de sódio e hiperpolariza a membrana, aumentando o potencial negativo intracelular e dirigindo os sistemas de transporte passivo (e, portanto, o transporte iônico transcelular). Além disso, o transporte de sódio (e de cloreto) é acompanhado pelo transporte passivo de água, que é tanto paracelular (através das *tight junctions*) como transcelular (por transportadores membranares de água, as aquaporinas).

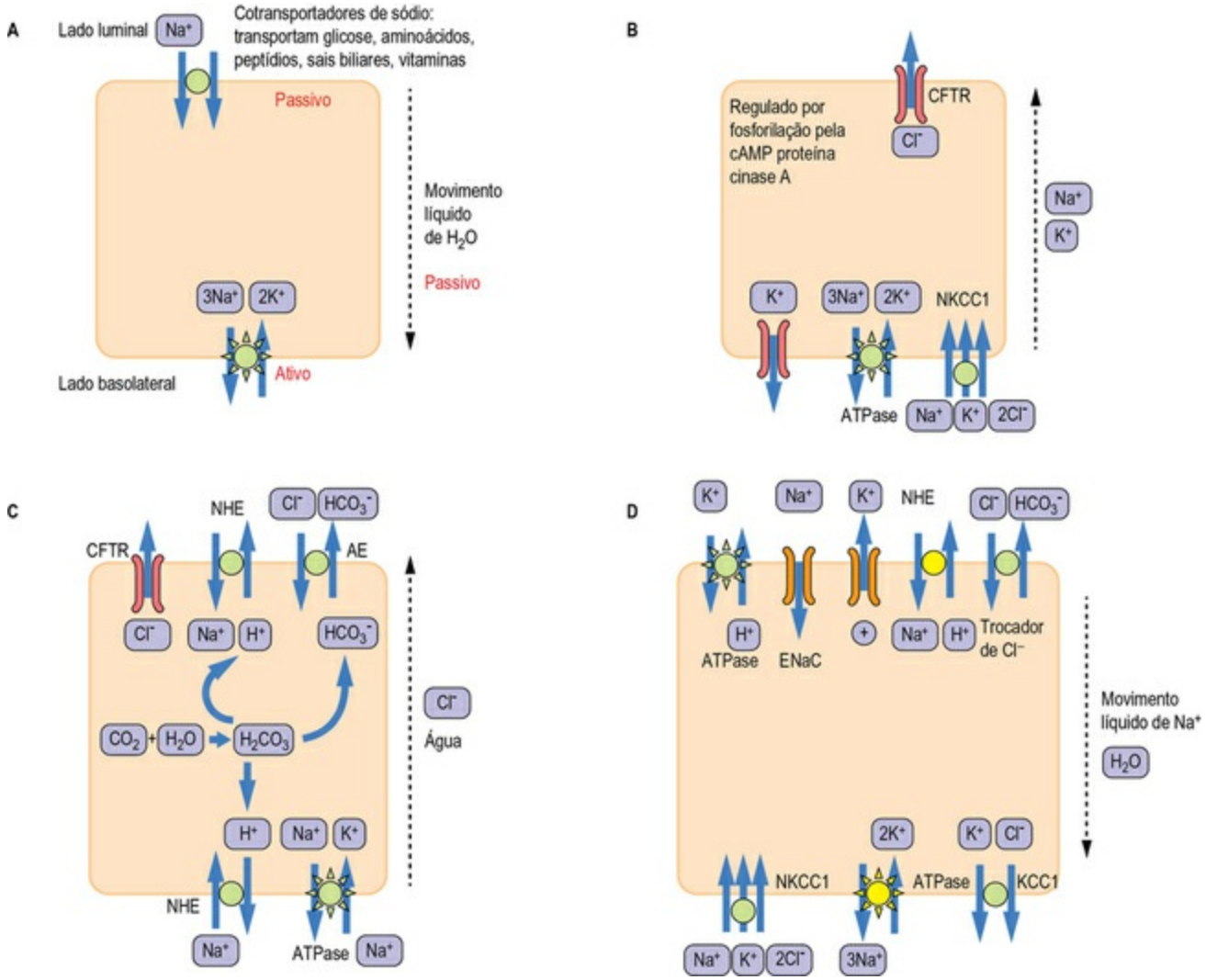


FIG. 10.2 Sistemas de transporte intestinal de eletrólitos.
(A) Os cotransportadores de sódio transportam uma vasta gama de substratos, incluindo a glicose. O gradiente de sódio é criado pela Na^+/K^+-ATPase localizada na membrana basolateral. **(B)** O transportador CFTR secreta o íon cloreto e é regulado pela cascata de sinalização cAMP-PKA. O sódio e o potássio podem também ser secretados como contraíons. Note o canal de "escape" de potássio na membrana basolateral. O transportador NKCC1 fornece cloreto à célula. **(C)** Absorção eletroneutra de sódio e secreção de bicarbonato. **(D)** Absorção eletrogênica de sódio e secreção de potássio no cólon distal. Os transportadores assinalados em **amarelo** são regulados pela **aldosterona** no cólon distal. Consultar o texto para mais detalhes. CFTR, regulador de condutância transmembranar de fibrose cística; NHE, trocador de sódio/hidrogênio; ENaC, canal epitelial de sódio; AE, trocador de ânions (trocador de cloreto/bicarbonato); NKCC1, cotransportador de Na^+ K^+ Cl^-; KCC1, cotransportador de K^+ Cl^-.

Os cotransportadores de sódio são um modo comum de transporte intestinal

Os cotransportadores de sódio transportam o íon sódio em conjunto com outra molécula (Fig. 10.2A). Por exemplo, a glicose é absorvida juntamente com o sódio por um cotransportador de sódio-glicose presente na membrana luminal, conhecido como **SGLT-1** (transportador de sódio/glicose 1). A glicose é subsequentemente lançada no plasma, na membrana basolateral, pelo transportador **GLUT2** (Fig. 10.7, em baixo). A descoberta da ligação entre o transporte intestinal de sódio e da glicose teve enormes consequências clínicas. Foi durante uma epidemia de cólera em Manila, no final da década de 1960, que os investigadores observaram que os pacientes que haviam desidratado devido à diarreia

não absorviam bem cloreto de sódio oral ao longo das tentativas de reidratação oral. Contudo, começavam a fazê-lo quando a glicose era igualmente fornecida. Essa observação conduziu à formulação da **solução de reidratação oral da OMS**, que posteriormente salvou a vida de milhões de crianças afetadas por diarreia grave em todo o mundo.

Outras formas de transporte de sódio são o transporte eletroneutro (Fig. 10.2B) e eletrogênico

O transporte eletroneutro de sódio ocorre através do trocador de sódio/hidrogênio **(NHE)**, geralmente combinado com o transporte de cloreto via trocador de cloreto/bicarbonato, conhecido como trocador AE (Fig. 10.2C). Os trocadores estão presentes tanto nas membranas luminais como nas basolaterais. Esse tipo de transporte é responsável por grande parte da reabsorção de cloreto de sódio no cólon. No cólon distal, o trocador NHE é suprarregulado por glicocorticoides.

A absorção eletrogênica de sódio ocorre através dos canais epiteliais de sódio (**ENaCs**, também conhecidos como canais de sódio sensíveis à amilorida), que estão presentes no lado luminal do epitélio (Fig. 10.2D). Os ENaCs são regulados por esteroides (aldosterona) e são importantes particularmente no cólon distal. A absorção de Na^+ é acompanhada pelo fluxo de Cl^- através de um canal de cloreto (o qual pode ser o CFTR – ver adiante). A aldosterona também suprarregula a Na^+/K^+-ATPase

Transporte de cloreto: o regulador de condutância transmembranar de fibrose cística (CFTR)

A secreção luminal de cloreto ocorre através do regulador de condutância transmembranar da fibrose cística (CFTR; Fig. 10.2B). O CFTR é um canal iônico membranar com um único polipeptídio. Está igualmente presente nos epitélios do pulmão e glândulas sebáceas. Sua função é controlada pela cascata de sinalização da proteína G-cAMP-proteína cinase A (PKA) (Cap. 40). Uma vez que o CFTR é ativado pelo cAMP, pela prostaglandina E_2 (PGE_2) e pela serotonina, assim como pela toxina da cólera e pela enterotoxina estável ao calor da *E. coli*, todos ativam a secreção de cloreto. Por outro lado, mutações que impliquem perda de função do CFTR são a causa da **fibrose cística**, na qual o transporte de cloreto está comprometido ou inibido. O CFTR também tem uma função reguladora: sua fosforilação inibe o trocador NHE, diminuindo a absorção de Na^+. Um aspecto interessante é que o CFTR também é capaz de transportar cloreto na direção oposta, auxiliando a reabsorção de cloreto (ver anteriormente).

A captação basolateral de Cl^- ocorre através do cotransportador de Na^+ K^+ Cl^- (conhecido como NKCC1) e através de trocadores de cloreto/bicarbonato.

A absorção de potássio e a secreção de potássio no cólon são auxiliadas por vários canais de potássio

A absorção de potássio é mediada por **H^+/K^+ ATPases** (pertencentes à família das ATPases tipo P) na membrana luminal. Por outro lado, o transporte basolateral de potássio ocorre por meio de canais de potássio e do cotransportador de K^+ e Cl^- **(KCC1)**.

Tanto os canais basolaterais quanto os luminais de K^+ são necessários para hiperpolarizar a membrana, no sentido de estabelecer uma força motriz para o transportador ENaC.

A secreção de K^+ através dos canais luminais de K^+ é paralela à secreção de Cl^- através do CFTR e é similarmente estimulada pelo cAMP, pelo cGMP e pela proteína cinase C (PKC). A expressão dos canais luminais de K^+ é também estimulada pela aldosterona e por glicocorticoides.



Quadro clínico

Fibrose cística

A fibrose cística, um distúrbio autossômico recessivo monogênico, envolve a inibição do transporte de cloreto devido à ausência do CFTR. Diferentes mutações no gene *CFTR* levam ou à ausência completa do transportador ou ao comprometimento de sua atividade.

A prevalência da FC é de 1:3.000 nascimentos nos EUA e norte da Europa. Nos EUA, a fibrose cística é a causa número um de **má absorção.** Essa se manifesta predominantemente na infância. Os principais problemas são geralmente respiratórios. A secreção de cloreto está diminuída e a reabsorção de Na^+ encontra-se acelerada. Isso resulta em hidratação diminuída das secreções epiteliais. No trato respiratório, ocorre **hidratação diminuída do muco das vias respiratórias** e, portanto, falha em sua remoção, com as infecções bacterianas subsequentes. Os problemas gastrintestinais incluem **íleo meconial** e **obstrução intestinal.** A ausência do CFTR também afeta o funcionamento do trocador Cl^-/HCO_3^- (e, dessa forma, a secreção passiva de Na^+), o que compromete a secreção enzimática pancreática. As secreções biliares espessas podem ser uma causa de **cirrose biliar** focal e de **colelitíase crônica.** Ocorre também um comprometimento da secreção de muco nas criptas colônicas, com reabsorção de Na^+ acentuada através de canais de Na^+ e de transportadores Na^+/H^+.

A reabsorção de ácidos graxos de cadeia curta ocorre conjuntamente com a secreção de bicarbonato

O cólon reabsorve ácidos graxos de cadeia curta (SCFA) resultantes da fermentação bacteriana de fibra, e isso se combina com a secreção de bicarbonato. O bicarbonato é secretado usando os trocadores de ânions luminais $SCFA/HCO_3^-$ ou Cl^-/HCO_3^-.

As aquaporinas controlam a reabsorção de água no cólon

A reabsorção de água no cólon é mediada por canais iônicos conhecidos como aquaporinas (AQP). As AQP1, 3 e 4 estão localizadas nas membranas basolaterais e a AQP8 nas membranas luminais. Os sistemas intestinais de transporte de eletrólitos se encontram resumidos na Figura 10.2.

O pH das secreções intestinais varia

A concentração do íon hidrogênio varia largamente em partes diferentes do trato GI. Isso é essencial ao processo digestivo e para a proteção dos tecidos subjacentes no estômago e nos intestinos. A saliva secretada na boca é alcalina devido ao seu conteúdo em bicarbonato. Por outro lado, os conteúdos do estômago são fortemente ácidos, mas o muco que protege suas paredes é alcalino. Assim, enquanto as células parietais do estômago secretam elevadas quantidades de íon hidrogênio (principalmente através da ação da H^+/K^+-ATPase), as células da superfície gástrica secretam muco contendo íon bicarbonato; elas empregam o trocador Cl^-/HCO_3^-. À entrada do duodeno, o conteúdo ácido do estômago é neutralizado pelas secreções pancreáticas fortemente alcalinas (devido ao conteúdo em bicarbonato).

Digestão

Há um componente significativo da digestão que é mecânico. A mastigação decompõe a comida para permitir sua deglutição, enquanto a adição de saliva na boca inicia o processo digestivo e atua como lubrificante para facilitar a deglutição. O alimento é então movimentado para o esôfago através de um processo impulsionado pelo reflexo esofágico. À medida que é transferido para o estômago, é quebrado em partículas menores. A presença de alimento digerido provoca peristaltismo, o que ajuda a misturar e estimular as secreções digestivas. Os principais estímulos para o peristaltismo são mediados através do sistema nervoso parassimpático. A absorção de nutrientes depende da velocidade do trânsito: assim, uma motilidade aumentada pode conduzir a má absorção.

O estômago e os intestinos são revestidos por epitélio, o qual tem uma superfície invaginada que aumenta bastante suas áreas. O intestino delgado é revestido por enterócitos arranjados em vilosidades intestinais e, adicionalmente, cada célula contém microvilosidades. A área de superfície absortiva total do intestino é de aproximadamente 250 m^2, quase a área de um campo de basquetebol júnior.

A digestão é uma série sequencial e ordenada de processos

Os carboidratos, as proteínas e as gorduras são decompostos em produtos absorvíveis. Algum material ingerido, tais como carboidratos complexos de origem vegetal, é indigerível e constitui a fibra.

Quadro de conceitos avançados

Função digestiva do estômago

Existem diferentes tipos celulares na parede mucosa do estômago, desempenhando diferentes funções digestivas. As células chamadas "células principais" secretam **pepsinogênio**, que é o precursor da **pepsina.** O pepsinogênio é ativado à pepsina no ambiente ácido do lúmen do estômago. As células parietais produzem **íons hidrogênio** por meio da ação da anidrase carbônica e, em seguida, os bombeiam para o lúmen

através de uma bomba de prótons na membrana luminal. A secreção de H^+ depende do transporte paralelo pelo canal de K^+ luminal.

A atividade das células parietais é estimulada pela ação da **histamina** que atua nos receptores H_2 (Cap. 41), produzida por células secretoras de histamina. O hormônio **gastrina** é secretado pelas células G e é estimulado pela entrada de alimentos no estômago. As células do estômago também secretam o **fator intrínseco (IF)**, que facilita a absorção de vitamina B_{12} no intestino (Cap. 11). Por último, porém não menos importante, as células epiteliais secretam muco alcalino, que protege o revestimento do estômago dos efeitos do ácido forte.

O dano no revestimento do estômago ou do duodeno causa **ulceração.** O tratamento de sintomas relacionados com acidez, tais como **dispepsia** ou **refluxo gastroesofágico**, pode ser realizado com **antiácidos**, que simplesmente neutralizam o pH, **antagonistas H_2** (p. ex., cimetidina ou ranitidina), que evitam a liberação de histamina, ou **inibidores da bomba de prótons** (p. ex., omeprazol), que bloqueiam a secreção de H^+ pelas células parietais.

O processo de digestão é caracterizado por várias etapas que ocorrem em uma sequência, permitindo a interação entre fluidos, pH, agentes emulsificantes e enzimas. Isto, por sua vez, requer a ação secretora conjunta das glândulas salivares, fígado e vesícula biliar, do pâncreas e da mucosa intestinal. Os processos envolvidos estão esboçados na Figura 10.1 e podem ser resumidos como:

- Lubrificação e homogeneização de alimentos com fluidos secretados pelas glândulas do trato gastrintestinal, começando na boca
- Secreção de enzimas que quebram macromoléculas para formar uma mistura de oligômeros, dímeros e monômeros
- Secreção de eletrólitos, íons hidrogênio e bicarbonato em partes diferentes do trato GI para otimizar as condições para a hidrólise enzimática
- Secreção de ácidos biliares para emulsionar os lipídios da dieta, facilitando a hidrólise enzimática apropriada e a absorção
- Posterior hidrólise de oligômeros e dímeros por enzimas ligadas a membranas (jejuno)
- Transporte específico de material digerido para os enterócitos e daí para o sangue ou linfa
- Reciclagem de ácidos biliares; absorção dos SCFA produzidos pela fermentação bacteriana no cólon
- Reabsorção de água e de eletrólitos.

Capacidade de reserva no trato intestinal

Existe uma considerável reserva funcional em todos os aspectos da digestão e da absorção

Devido a esse fato, uma pequena perda funcional pode passar despercebida, permitindo

que a patologia progrida por algum tempo antes de ser diagnosticada. Sinais e sintomas de má digestão ou má absorção GI requerem um prejuízo considerável da relação estrutura/função para se manifestarem. Cada um dos órgãos envolvidos na digestão e na absorção tem a capacidade de aumentar sua atividade várias vezes em resposta a estimulação específica; isso aumenta enormemente a capacidade de reserva. Por exemplo, para uma doença do pâncreas se manifestar, 90% da função pancreática precisa ser destruída.

Note também que a digestão de um nutriente particular ocorre em vários locais no trato GI. Lipídios, carboidratos e proteínas podem ser digeridos em múltiplos pontos ao longo do trato GI. Deste modo, o comprometimento dos mecanismos digestivos em um único ponto dificilmente causará incapacidade completa de digerir um grupo de nutrientes (Fig. 10.3).

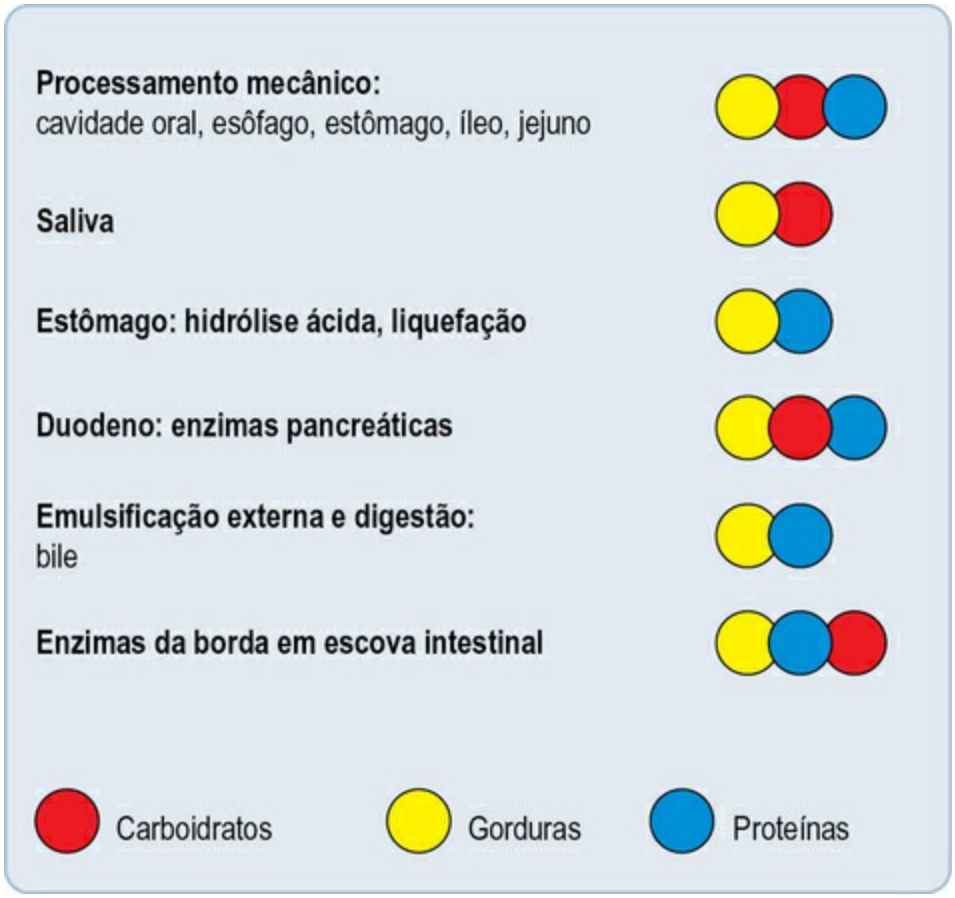


FIG. 10.3 A digestão como um processo multiorgânico.
Cada um dos principais grupos de nutrientes (carboidratos, proteínas e gorduras) sofre digestão em múltiplos pontos.

O trato GI pode prover a perda de função de um órgão constituinte em particular. Por exemplo, se o estômago for removido cirurgicamente, o pâncreas e o intestino delgado podem compensar a perda da digestão gástrica. Por outro lado, em uma doença pancreática, as lipases linguais podem prover alguma perda de lipase pancreática.

Enzimas digestivas e zimogênios

A maioria das enzimas digestivas é secretada como precursores inativos

Com exceção da amilase salivar e lipase lingual (associada à língua e, por essa razão, oral), as enzimas digestivas são secretadas no lúmen intestinal como precursores inativos chamados zimogênios (Cap. 6). A secreção de enzimas é semelhante nas glândulas salivares, na mucosa gástrica e no pâncreas. Esses órgãos contêm células especializadas para a síntese, armazenamento e transporte de grânulos de zimogênios para a superfície celular, e daí ao lúmen intestinal. Essas secreções são denominadas exócrinas, isto é, "secretam para fora", ao contrário da secreção endócrina de hormônios.

As enzimas envolvidas na digestão de proteínas (proteases) e de gorduras (lipase: fosfolipase A_2) são sintetizadas como zimogênios inativos e são ativadas somente quando liberadas no lúmen intestinal. Em geral, essas enzimas, uma vez em sua forma ativa, podem ativar seus próprios precursores. A ativação de seus precursores pode também ocorrer por mudança de pH (p. ex., o pepsinogênio no estômago é convertido, em pH abaixo de 4,0, em pepsina) ou pela ação de enteropeptidases específicas ligadas à membrana da mucosa do duodeno (Fig. 10.1).

Todas as enzimas digestivas são hidrolases

Todas as enzimas digestivas hidrolisam seus substratos. Os produtos de tais processos hidrolíticos são oligômeros, dímeros e monômeros da macromolécula precursora. Assim, os carboidratos são hidrolisados a uma mistura de dissacarídios e monossacarídios. As proteínas são quebradas em uma mistura de di e tripeptídios e aminoácidos. Os lipídios são desdobrados em uma mistura de ácidos graxos (AG), glicerol e mono e diacilgliceróis (Fig. 10.4).

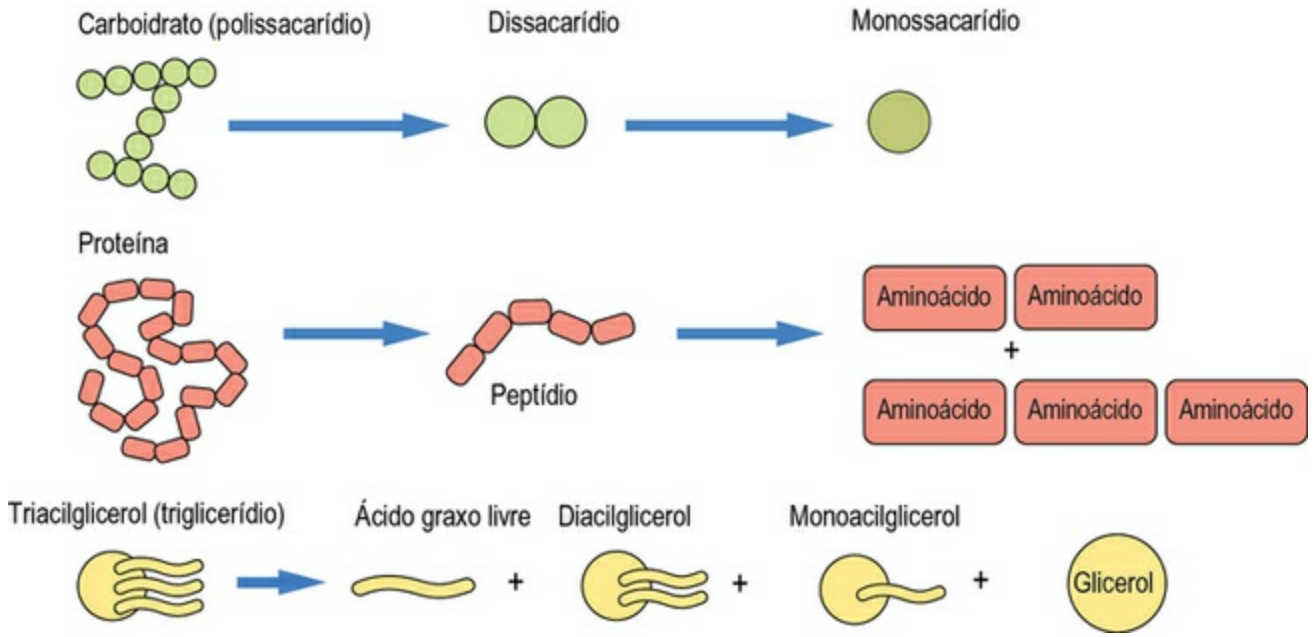


FIG. 10.4 Digestão de polímeros da dieta.
Os polissacarídios são digeridos para fornecer di e monossacarídios, e as proteínas, para fornecer os aminoácidos componentes. A digestão de gordura (triacilgliceróis) consiste na remoção gradual de moléculas de ácidos graxos, produzindo di e monoacilgliceróis.

Digestão e absorção de carboidratos

Os carboidratos da dieta entram no trato GI como mono, di e polissacarídios

Os carboidratos da dieta consistem, principalmente, em amidos (polissacarídios) de origem animal e vegetal, os dissacarídios sacarose e lactose, e os monossacarídios (Fig. 10.5). Os monossacarídios incluem glicose, frutose e galactose, os quais tanto estão presentes na dieta como são produzidos pela digestão de di e polissacarídios. A lactose, por exemplo, é um dissacarídio derivado de produtos lácteos, e é hidrolisada nos monossacarídios glicose e galactose pela lactase e β-galactosidase. Esses monômeros de açúcar podem ser absorvidos a partir do trato GI.

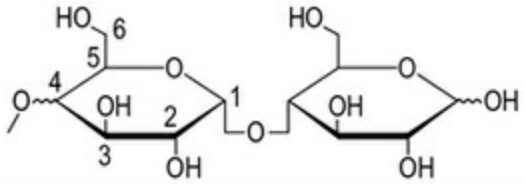
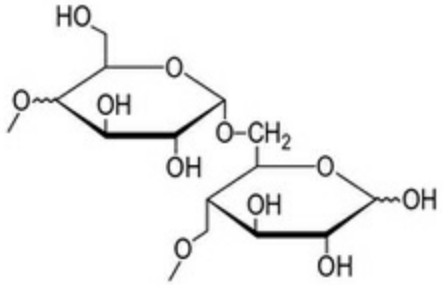
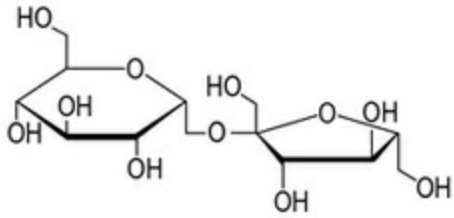
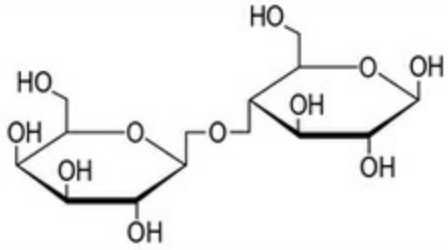
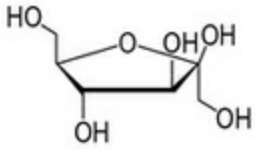
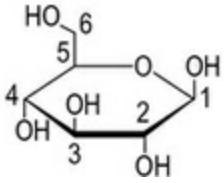
Carboidrato	Fonte alimentar	Estrutura
Amido (amilose) [vegetal]	Batatas, arroz, pão, cebolas	
Amilopectina (glicogênio) [vegetal, animal]	Batatas, arroz, pão, músculo, fígado	
Sacarose	Sobremesas, doces, "açúcar"	
Lactose	Leite	
Frutose	Frutas, mel	
Glicose	Frutas, mel	

FIG. 10.5 Estrutura dos principais carboidratos da dieta.
O amido e a amilopectina são polissacarídios, e apenas duas moléculas de açúcar são mostradas para cada um, para ilustrar as ligações intermoleculares. A sacarose e a lactose são os dissacarídios mais comuns, e a frutose e a glicose são os monossacarídios mais comuns. Recorra à molécula de glicose para a numeração padrão dos átomos de carbono (ver também o Cap. 3).

Dissacarídios e polissacarídios, tais como amido e glicogênio, requerem clivagem hidrolítica em monossacarídios antes da absorção

Os dissacarídios são quebrados por dissacaridases de membrana presentes na superfície da mucosa intestinal. O amido e o glicogênio requerem capacidade hidrolítica adicional da enzima amilase encontrada nas secreções das glândulas salivares e do pâncreas (Fig. 10.6).

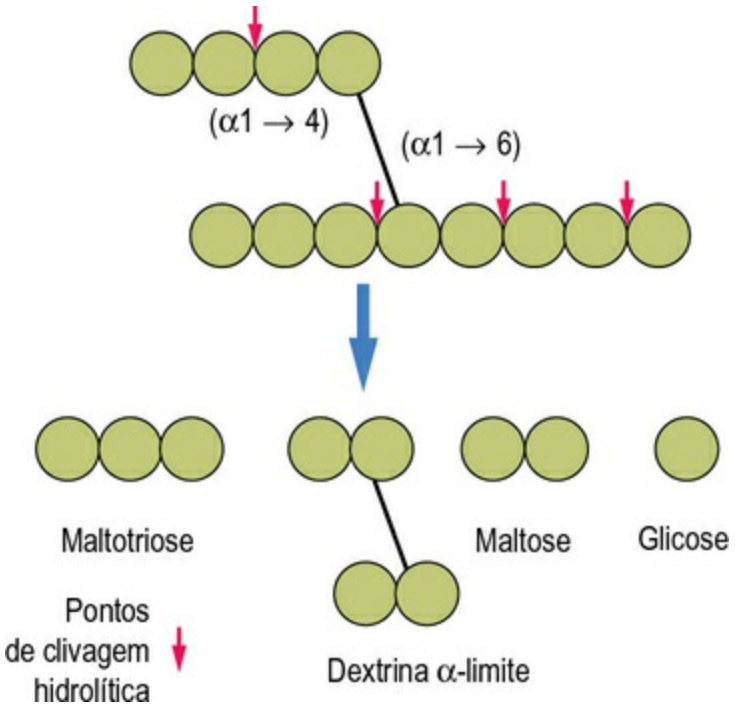


FIG. 10.6 Clivagem hidrolítica de polissacarídios.
A hidrólise enzimática é o mecanismo de digestão de polissacarídios e dissacarídios. As setas ilustram os pontos de clivagem e o tipo de ligação hidrolisada. Note que a dextrina α-limite ainda contém tanto ligações α-1,4 como ligações α-1,6.

Quadro de conceitos avançados

Papel da amilase, das α-glicosidases e da isomaltase na digestão de polissacarídios

Durante a alimentação, a homogeneização dos alimentos ocorre por meio da mastigação. Esta é auxiliada pelas contrações dos músculos das paredes do estômago e das dobras gástricas. Uma consequência disso é que os polissacarídios da dieta se tornam hidratados. Isso é essencial para a ação da **amilase**, que é específica para as ligações α-1,4-glicosídicas internas e não para as ligações α-1,6. A amilase também não atua nas ligações α-1,4 de resíduos de glicosil que servem como unidades ramificadoras. Assim, as unidades clivadas formadas por sua ação são o dissacarídio maltose, o trissacarídio maltotriose e um oligossacarídio com uma ou mais ramificações α-1,6 e que contêm, em média, oito unidades glicosil, chamadas de "dextrinas α-limites". Esses compostos são, então, posteriormente clivados em unidades de glicose pela **oligossacaridase** e **α-glicosidase,** sendo esta última a responsável por remover os resíduos de glicose de oligossacarídios com ligações α-1,4 (incluindo a maltose). Um complexo **sacarase-isomaltase** é secretado como uma única molécula polipeptídica precursora e é ativado em duas enzimas separadas, uma das quais (isomaltase) é responsável pela clivagem hidrolítica das ligações α-1,6 glicosídicas. Dessa forma, o produto final da digestão dos amidos é a glicose. A amilase ocorre na forma livre no lúmen, enquanto as α-glicosidases e a **isomaltase** estão ligadas à membrana do enterócito.

O amido é um polissacarídio vegetal e o glicogênio é o seu equivalente animal. Ambos contêm uma mistura de cadeias lineares de moléculas de glicose ligadas por ligações glicosídicas α-1,4 (amilose) e por cadeias ramificadas de glicose com ligações α-1,6 (amilopectina). O glicogênio dispõe de uma estrutura bem mais ramificada que o amido. A digestão desses polissacarídios é promovida pelas endossacaridases e pela amilase.

Os produtos da hidrólise do amido são o dissacarídio maltose, o trissacarídio maltotriose e uma unidade ramificada, denominada dextrina α-limite. Esses produtos são hidrolisados novamente por enzimas ligadas aos enterócitos, para formar, em último lugar, o monossacarídio glicose (Fig. 10.7A).

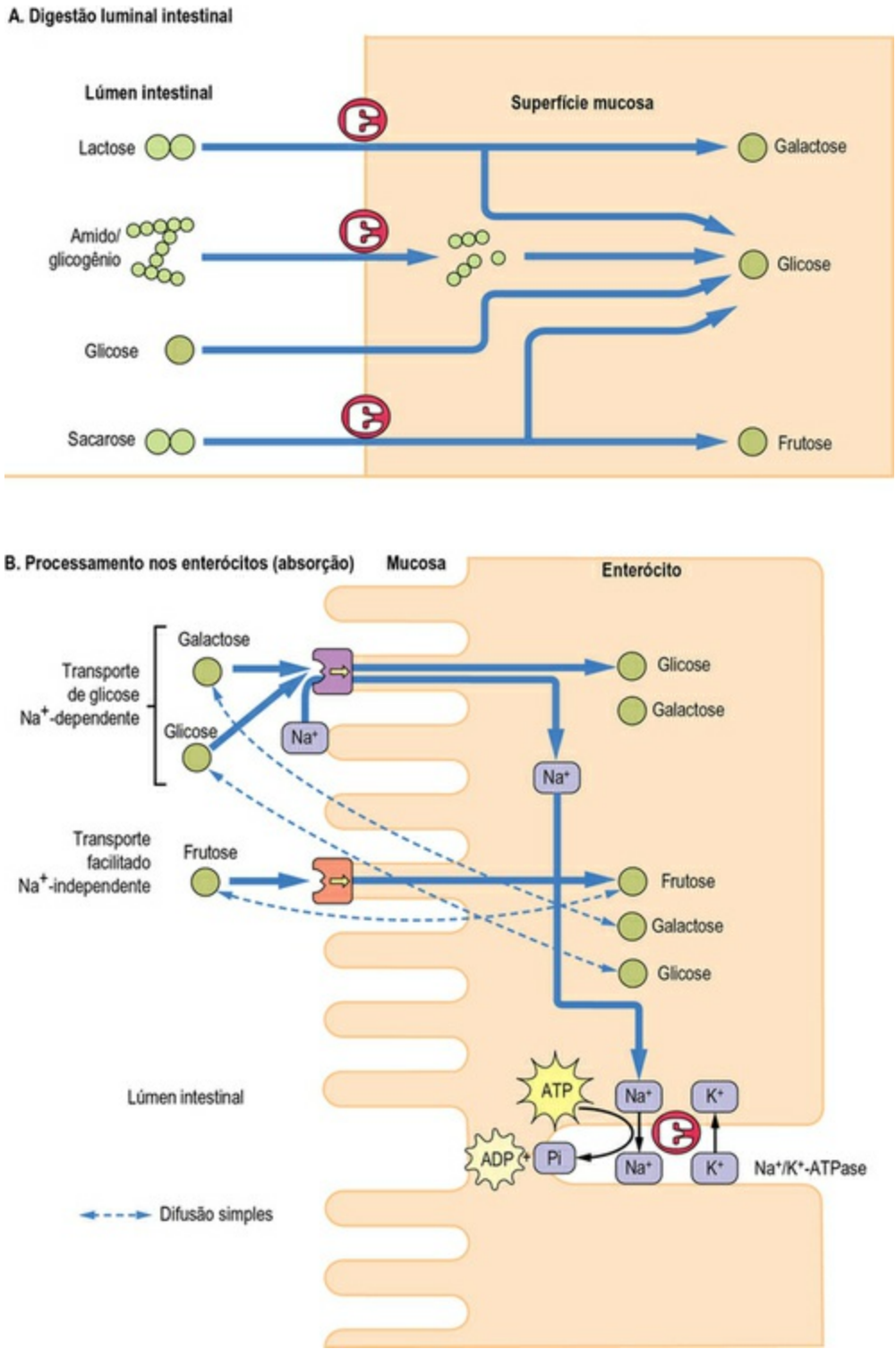


FIG. 10.7 Digestão e absorção de carboidratos da dieta.
(A) Os monossacarídios são liberados como resultado da hidrólise de diferentes polissacarídios. Observe que a digestão preliminar ocorre no lúmen intestinal e a etapa final ocorre na superfície mucosa. **(B)** Ligações entre a absorção de monossacarídios e de sódio e sua relação com a atividade da Na^+/K^+-ATPase. ADP, difosfato de adenosina; ATP, trifosfato de adenosina; Pi, fosfato inorgânico. Compare com a Figura 8.5.

Os dissacarídios da dieta, tais como lactose, sacarose e trealose (um dissacarídio composto por duas moléculas de glicose unidas por uma ligação α-1,1), são hidrolisados em seus monossacarídios constituintes por dissacaridases específicas ligadas às membranas da borda em escova do intestino delgado. Os domínios catalíticos dessas enzimas estão voltados para o lúmen do intestino para reagir com seus substratos específicos, enquanto o(s) domínio(s) não catalítico(s) estrutural(is) está(ão) ligado(s) à

membrana do enterócito.

As dissacaridases são indutíveis, com exceção da lactase

Quanto maior a quantidade de um dissacarídio (p. ex., sacarose) presente na dieta ou produzido pela digestão, maior será a quantidade de dissacaridase específica relevante (p. ex., sacarase) produzida pelos enterócitos. A etapa limitante na taxa de absorção de dissacarídios da dieta é, portanto, o transporte dos monossacarídios resultantes. A lactase, por outro lado, é uma dissacaridase não indutível da borda em escova, por isso o fator limitante da taxa de absorção da lactose é a sua hidrólise.

Sistemas de transporte ativos e passivos transportam monossacarídios através da membrana da borda em escova

O processo de digestão resulta em grande aumento no número de partículas de monossacarídios osmoticamente ativas no lúmen intestinal. A água será, dessa forma, retirada da mucosa do trato GI e do compartimento vascular para o lúmen. Assim, o aumento da hidrólise na borda em escova aumentará a carga osmótica, enquanto o transporte aumentado de monossacarídios através da borda em escova do enterócito irá diminuí-la. Para a maioria das oligo e dissacaridases, o transporte dos monômeros resultantes é um fator limitante. À medida que as concentrações de açúcares monoméricos (e a osmolalidade) aumentam no lúmen intestinal, há diminuição compensatória na atividade das dissacaridases da borda em escova. Isso controla a carga osmótica e evita o movimento dos fluidos.



Quadro clínico

Tipos de diarreia

A diarreia pode ser causada pelos solutos não absorvíveis presentes nos intestinos (diarreia osmótica), por falha tanto da digestão quanto da absorção de nutrientes, e também pelos agonistas secretores (diarreia secretora).

A **diarreia osmótica** pode ser causada por má absorção, deficiências em enzimas digestivas ou intestino curto e doença inflamatória.

A **diarreia secretora** pode ser causada por infecções, má absorção de sais biliares, má absorção de gordura ou por causas endócrinas, como a síndrome carcinoide ou a síndrome de Zollinger-Ellison. As principais causas da diarreia inflamatória são a doença de Crohn, a colite ulcerosa e a síndrome do cólon irritável.

A absorção pode estar comprometida e a secreção aumentada em condições que levam à inflamação intestinal **(diarreia inflamatória)**. Caracteristicamente, a diarreia secretora, mas não a osmótica, persiste durante o jejum.

A glicose, a frutose e a galactose são os monossacarídios primários resultantes da digestão dos carboidratos da dieta. A absorção desses açúcares e de outros

monossacarídios menos importantes ocorre por meio de mecanismos específicos mediados por transportadores (Fig. 10.7B), todos os quais demonstram especificidade para o substrato e estereoespecificidade, exibem cinética de saturação e podem ser especificamente inibidos. Além disso, todos os monossacarídios podem atravessar a membrana da borda em escova por difusão simples, embora esta seja extremamente lenta.

Existem pelo menos dois sistemas de transporte mediados por carreadores para os monossacarídios

Na membrana da borda em escova, tanto a glicose quanto a galactose são transportadas pelo transportador de glicose sódio-dependente anteriormente mencionado. Essa proteína relacionada com a membrana liga-se à glicose (ou galactose) e ao Na^+, em locais separados, e transporta ambos para o citosol dos enterócitos. O Na^+ é transportado a favor de seu gradiente de concentração (a concentração no lúmen intestinal excede a do interior da célula), levando junto a glicose *contra* seu gradiente de concentração. Esse mecanismo de transporte é ligado à Na^+/K^+-ATPase. O transporte de glicose ou galactose é, assim, um processo ativo indireto.



Quadro clínico

Um rapaz com desconforto e distensão abdominal e diarreia: intolerância à lactose

Um menino afro-americano de 15 anos foi ao Reino Unido em uma visita de intercâmbio de 2 meses. Após 2 semanas no Reino Unido, queixou-se de desconforto abdominal, sensação de inchaço, maior volume urinário e, mais recentemente, de desenvolvimento de diarreia. A única alteração registrada na dieta foi a introdução de leite. Havia desenvolvido um gosto considerável por leite e andava consumindo um a dois pacotes grandes por dia. Foi efetuado um teste de tolerância à lactose, através do qual foram fornecidos ao jovem 50 g de lactose para beber em um veículo aquoso. Os níveis plasmáticos de glicose não se elevaram mais que 1 mmol/L (18 mg/dL) durante as 2 horas seguintes, com amostragens em intervalos de 30 minutos. Foi feito um diagnóstico de intolerância à lactose.

Comentário

A intolerância à lactose resulta da deficiência adquirida de lactase. A atividade da lactase diminui com o aumento da idade nas crianças, mas a extensão desse declínio de atividade é determinada geneticamente e demonstra variação étnica. A deficiência de lactase na população negra adulta varia entre 45 e 95%. Caso os sintomas da má absorção ocorram após a introdução de leite na dieta adulta, o diagnóstico de deficiência adquirida em lactase deve ser considerado. O diagnóstico é feito testando o intestino delgado com lactose e monitorando a subida da glicose plasmática. Um aumento de mais de 1,7 mmol/L (30 mg/dL) é considerado normal. Um aumento de

menos de 1,1 mmol/L (20 mg/dL) é diagnóstico de deficiência em lactase. Um aumento de 1,1-1,7 mmol/L (20-30 mg/dL) é inconclusivo.

A frutose é transportada através da membrana da borda em escova por um processo de difusão facilitada sódio-independente envolvendo o transportador de glicose associado à membrana GLUT-5, que está presente no lado da borda em escova do enterócito, e o GLUT 2, que transfere monossacarídios do interior do enterócito para a circulação (Tabela 8.2).

Uma incompleta digestão de carboidratos (os componentes da fibra) provoca sua conversão em ácidos graxos de cadeia curta (acetato, propionato, butirato) pelas bactérias do cólon.



Quadro clínico

Um jovem com perda de peso, diarreia, inchaço abdominal e anemia: doença celíaca

Um homem de 22 anos apresentou histórico de perda de peso, diarreia, distensão abdominal e anemia. Descreveu suas fezes como claras e grossas. As características hematológicas incluíam hemoglobina de 90 g/L (9 g/dL) (faixa de referência: 130-180 g/L; 13-18 g/dL). A biópsia de seu intestino delgado demonstrou achatamento da superfície mucosa, atrofia das vilosidades e desaparecimento de microvilosidades. Foi feito um diagnóstico de enteropatia induzida pelo glúten (doença celíaca). Todos os produtos contendo trigo foram removidos da dieta do paciente e os sintomas desapareceram.

Comentário

A doença celíaca é uma condição autoimune precipitada pela sensibilidade ao glúten, resultando em inflamação da mucosa do intestino delgado. O glúten é uma proteína de reserva do trigo, cevada e centeio. Na realidade, trata-se de uma mistura de proteínas, que incluem as gliadinas (a fração solúvel em álcool do glúten) e as gluteninas. As gliadinas atravessam a barreira intestinal durante as infecções, por exemplo, e desencadeiam a resposta imune. A reação inflamatória segue. O resultado é a atrofia das vilosidades e a hiperplasia das criptas. Uma vez que a superfície de absorção está bastante reduzida, a má absorção resultante pode ser grave.

Os anticorpos circulantes contra o glúten do trigo e suas frações estão frequentemente presentes em casos de doença celíaca. O diagnóstico envolve biópsia duodenal e testes à resposta a uma dieta sem glúten. Os autoanticorpos testados são **anticorpos antigliadina** e/ou **anticorpos transglutaminase** tecidual (a transglutaminase é uma enzima que promove a desamidação da gliadina na parede intestinal). A doença celíaca é subdiagnosticada, especialmente em pacientes com anemia não explicada.

Para valores de referência hematológicos, consulte a Tabela 5.2.

Quadro de conceitos avançados

Ácidos graxos de cadeia curta são produzidos no intestino grosso a partir de carboidratos não digeridos

A absorção diminuída de amido da dieta leva à produção bacteriana de ácidos graxos de cadeia curta (SCFA) pelas bactérias do cólon.

Os SCFA podem ser produzidos a partir de oligossacarídios fermentáveis, dissacarídios, monossacarídios e polióis (FODMAPs). Estudos animais demonstraram a presença do receptor 2 dos ácidos graxos de cadeia curta (FFA2), um receptor acoplado a proteínas G presente em células endócrinas intestinais. A ligação de SCFA libera serotonina, conduzindo ao aumento na motilidade intestinal.

Digestão e absorção de lipídios

Aproximadamente 90% da gordura na dieta corresponde a **triacilgliceróis (TAG; também denominados triglicerídios)**. Os demais consistem em colesterol, ésteres de colesterol, fosfolipídios e ácidos graxos não esterificados (AGNE).

As gorduras precisam ser esterificadas antes da digestão

A natureza hidrofóbica das gorduras impede o acesso das enzimas digestivas hidrossolúveis. Além disso, os glóbulos de gordura apresentam uma área de superfície limitada para a ação enzimática. Esses problemas são superados pelo processo de emulsificação. A mudança na estrutura física dos lipídios começa no estômago: a temperatura corporal ajuda a liquefazer os lipídios da dieta, e os movimentos peristálticos facilitam a formação de uma emulsão lipídica. As lipases salivares e gástricas, estáveis no meio ácido, também ajudam no processo de emulsificação. A taxa inicial de hidrólise é lenta devido à separação da fase lipídica da aquosa e à limitada interface lipídios-água. Uma vez iniciada a hidrólise, contudo, os TAG imiscíveis em água são degradados a ácidos graxos, os quais atuam como surfactantes. Eles conferem uma superfície hidrofílica às gotículas de lipídios e as quebram em partículas menores, aumentando a interface lipídios-água e facilitando a hidrólise. A fase lipídica se torna dispersa por toda a fase aquosa sob a forma de emulsão. Os fosfolipídios da dieta, os ácidos graxos e os monoacilgliceróis também atuam como surfactantes.

No duodeno, os sais biliares e as enzimas pancreáticas atuam na emulsão lipídica

A emulsão lipídica passa do estômago para o duodeno, onde ocorre digestão adicional, conduzida por enzimas secretadas pelo pâncreas. A liberação de sais biliares pela vesícula biliar, estimulada pelo hormônio colecistocinina, ajuda na solubilização.

A principal enzima secretada pelo pâncreas é a lipase pancreática. A lipase, todavia, permanece inativa na presença de sais biliares normalmente secretados no intestino delgado. Essa inibição é superada pela secreção concomitante da colipase pelo pâncreas. A colipase se liga tanto à interface água-lipídio como à lipase pancreática,

simultaneamente ancorando e ativando a enzima. Como indicado na Figura 10.8, apenas uma pequena porção de TAG da dieta é completamente hidrolisada em glicerol e ácidos graxos. Os "segundo" e "terceiro" ácidos graxos dos TAG são hidrolisados com dificuldade crescente; a lipase pancreática produz principalmente 2-monoacilgliceróis (2-MAG), os quais são absorvidos pelos enterócitos.

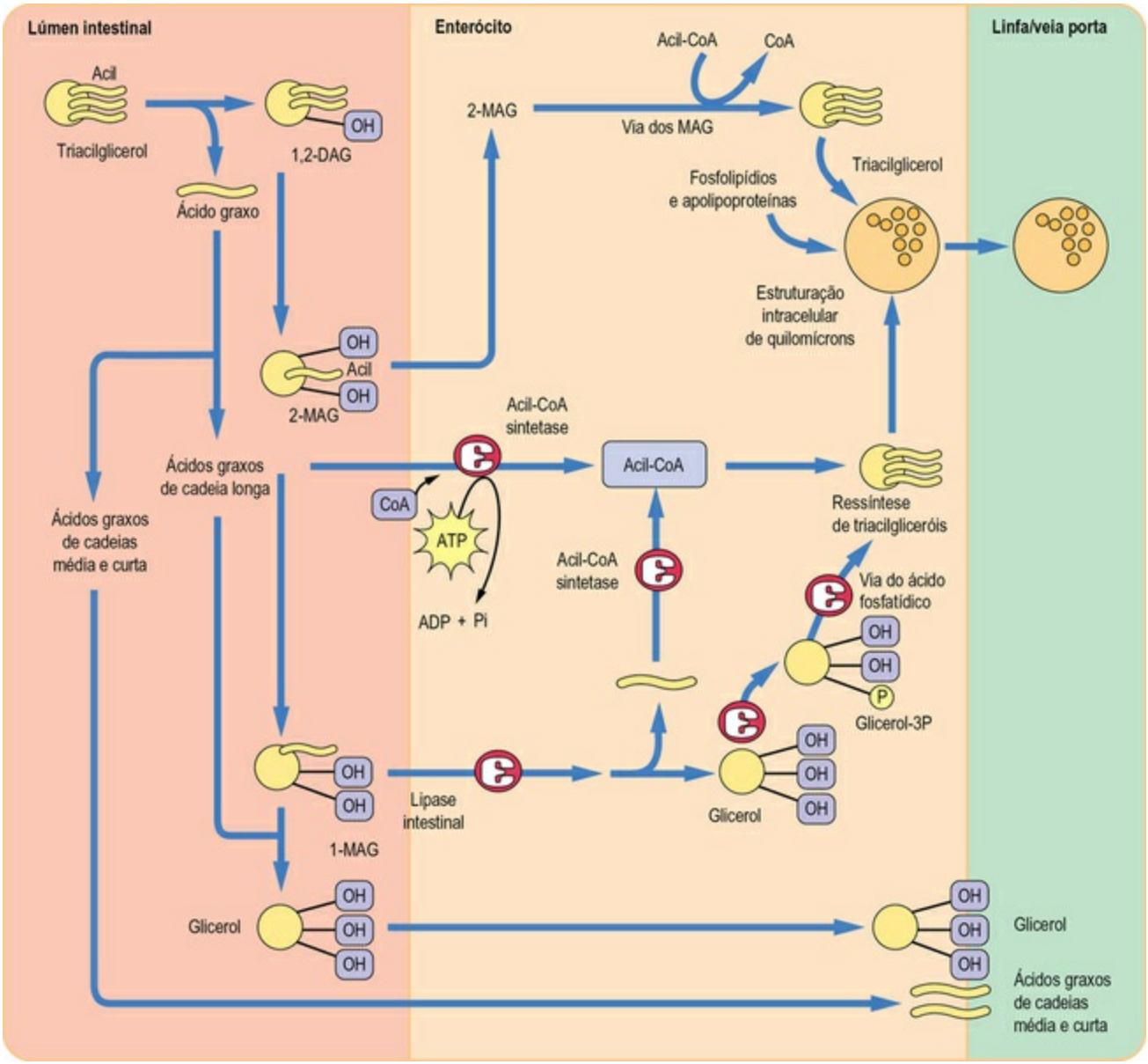


FIG. 10.8 Digestão e absorção dos lipídios da dieta.
Os triglicerídios da dieta sofrem graus variáveis de hidrólise no lúmen intestinal. Subsequentemente, os ácidos graxos de cadeias média e curta são absorvidos para o sistema porta. No entanto, os ácidos graxos de cadeia longa são ressintetizados a triacilgliceróis e, em seguida, incorporados em quilomícrons. Os ácidos graxos são ativados pela acetil-CoA para que ocorra a síntese de acilgliceróis. Note que os enterócitos não contêm glicerol cinase: a formação de glicerol fosfato requer a presença de glicose. TAG, triacilglicerol; DAG, diacilglicerol; MAG, monoacilglicerol; CoA, coenzima A. Reproduzido a partir de Dominiczak MH. Medical Biochemistry Flash Cards. London: Elsevier, 2012, Card 38.

Os sais biliares são essenciais para a solubilização de lipídios durante o processo digestivo

Os ácidos biliares (que são sais biliares no pH alcalino do intestino) atuam como detergentes e formam reversivelmente agregados lipídicos (micelas). As micelas são consideravelmente menores que as gotículas lipídicas. Seu tamanho depende da concentração de ácidos biliares e da razão entre ácidos biliares e lipídios.

Assim, o digerido lipídico se transforma de gotículas de emulsão de gordura em estruturas micelares. As micelas transportam os lipídios para a borda em escova do enterócito.

A absorção de lipídios para as células epiteliais que revestem o intestino delgado ocorre por difusão através da membrana plasmática. Quase todos os ácidos graxos e 2-MAG são absorvidos, pois ambos são hidrossolúveis. Os lipídios não hidrossolúveis são pouco absorvidos: apenas 30 a 40% do colesterol da dieta é absorvido. Os sais biliares passam para o íleo, onde eles próprios são reabsorvidos e transferidos novamente para o fígado. Este circuito é chamado de circulação êntero-hepática (Cap. 17).

O destino dos ácidos graxos depende do comprimento de suas cadeias

Os ácidos graxos de cadeias média e curta (com menos de dez átomos de carbono) passam diretamente pelos enterócitos para o sistema porta-hepático. Pelo contrário, ácidos graxos contendo mais de 12 átomos de carbono são ligados a uma proteína de ligação de ácidos graxos na célula e transferidos ao retículo endoplasmático rugoso para a ressíntese de TAG. O glicerol necessário a esse processo é obtido tanto a partir dos 2-MAG absorvidos (a via dos MAG, Fig. 10.8) como pela hidrólise de 1-MAG (que origina glicerol livre), ou a partir do glicerol-3-fosfato produzido durante a glicólise (via do ácido fosfatídico). O glicerol produzido no lúmen intestinal não é reutilizado no enterócito para a síntese de TAG, e passa diretamente para o sistema porta.

A síntese de triacilgliceróis requer ativação dos ácidos graxos

Todos os ácidos graxos de cadeia longa absorvidos são reutilizados para formar TAG antes de serem transferidos para os quilomícrons. A ativação de ácidos graxos é realizada pela acil-CoA sintetase. Os quilomícrons são estruturados no retículo endoplasmático rugoso antes de serem liberados por exocitose no espaço intercelular. Eles saem do intestino através da linfa (Cap. 18).

Digestão e absorção de proteínas

O intestino recebe 70 a 100 g de proteínas da dieta por dia e 35 a 200 g de proteínas endógenas. As últimas (principalmente enzimas) são secretadas no intestino ou liberadas no epitélio como resultado da renovação celular. A digestão e a absorção de proteínas são extremamente eficientes: dessa grande quantidade, apenas 1 a 2 g de nitrogênio, equivalentes a 6 a 12 g de proteínas, são perdidos diariamente nas fezes.

As proteínas são hidrolisadas por peptidases

As proteínas são quebradas por hidrólise das ligações peptídicas por peptidases. Essas enzimas podem tanto clivar ligações peptídicas internas (endopeptidases) quanto retirar

um aminoácido de cada vez do terminal –COOH (carboxipeptidases) ou $–NH_2$ (aminopeptidases) do polipeptídio. As endopeptidases quebram polipeptídios grandes em oligopeptídios menores, os quais podem ser posteriormente alvo da ação de exopeptidases para produzir aminoácidos e di e tripeptídios, os produtos finais da digestão de proteínas, que são absorvidos pelos enterócitos. Dependendo da fonte das peptidases, a digestão proteica pode ser dividida em fase gástrica, pancreática e intestinal (Fig. 10.9).

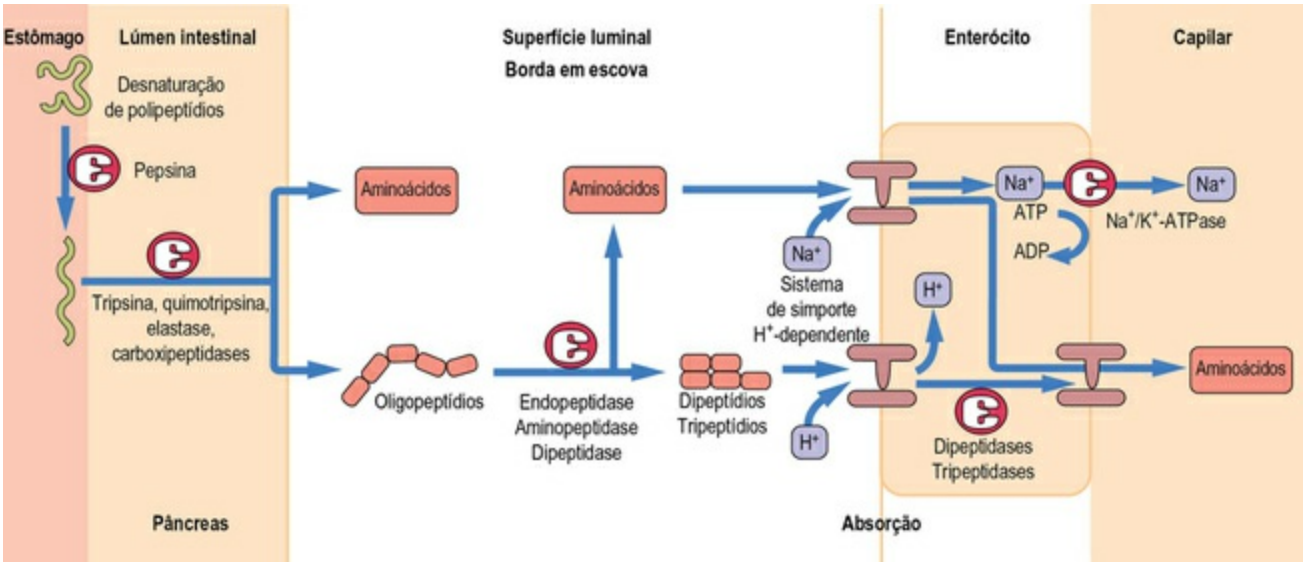


FIG. 10.9 Digestão e absorção de proteínas da dieta.
O estágio preliminar é a desnaturação proteica, a qual ocorre no estômago. As ligações peptídicas entre os aminoácidos são hidrolisadas pelas endo e exopeptidases. Aminoácidos simples e di e tripeptídios são absorvidos usando sistemas de transporte específicos localizados na membrana do enterócito.

Quadro clínico

Homem alcoólico com dor abdominal central: pancreatite

Um homem de 56 anos com longo histórico de uso abusivo de álcool apresentava dor abdominal central, perda de peso e diarreia. Descreveu suas fezes como claras, gordurosas e difíceis de evacuar. A radiografia abdominal revelou calcificação epigástrica na área do pâncreas, e o exame de tomografia computadorizada (TC) revelou um pâncreas calcificado atrófico. A amostra de fezes enviada para quantificação de elastase fecal conduziu a um resultado significativamente reduzido. Iniciou-se tratamento com suplementos de enzimas pancreáticas, resultando na resolução de sua diarreia e em ganho de peso.

Comentário

A pancreatite aguda é uma doença grave e potencialmente ameaçadora, causada por cálculos biliares que bloqueiam o ducto pancreático, por uso abusivo de álcool ou, mais raramente, por fármacos como a azatioprina, vírus como o da caxumba, ou

hipertrigliceridemia. Os pacientes apresentam dor abdominal grave, náuseas e vômitos. O marcador bioquímico mais importante da pancreatite é o **aumento da atividade da amilase no soro.** Além disso, podem ocorrer aumento da atividade da lipase e decréscimo de cálcio no soro.

A pancreatite crônica é uma consequência da inflamação prolongada e conduz a má nutrição e a **esteatorreia** (excessiva gordura fecal). Encontra-se também associada à falha da função endócrina pancreática, levando à hiperglicemia.



Quadro de conceitos avançados

Função exócrina do pâncreas

O pâncreas tem dois papéis funcionais distintos: uma função **exócrina** (*i.e.*, a secreção de enzimas digestivas através do ducto pancreático) e a função **endócrina** (*i.e.*, a secreção de insulina, glucagon e outros hormônios pelas ilhotas de Langerhans) (Cap. 21). Esses hormônios são responsáveis pelo controle glicêmico e por aspectos da função gastrintestinal.

As **secreções exócrinas** fluem para o ducto pancreático, que desemboca no duodeno juntamente com o ducto biliar comum ao fígado e à vesícula biliar. Os alimentos que entram no duodeno estimulam a secreção de colecistocinina que, por sua vez, ativa a produção e a secreção de enzimas pancreáticas. A entrada do conteúdo ácido do estômago no duodeno estimula a liberação de outro hormônio, a secretina, que estimula a produção do suco pancreático rico em bicarbonato, o qual neutraliza a acidez no duodeno.

O pâncreas secreta enzimas que digerem carboidratos, lipídios e proteínas. A **amilase** pancreática digere os carboidratos a oligossacarídios e monossacarídios; a **lipase** digere os triacilgliceróis, enquanto a **colesteril esterase** gera colesterol livre e ácidos graxos; finalmente, **proteases** e **peptidases** quebram proteínas e peptídios. Para evitar que as poderosas proteases digiram o próprio pâncreas (autodigestão), elas são secretadas como pró-enzimas (Cap. 6) e ativadas no lúmen intestinal.

A digestão proteica começa no estômago

No estômago, o HCl secretado reduz o pH para 1-2 com consequente desnaturação das proteínas da dieta. A desnaturação desenrola as cadeias polipeptídicas, tornando as proteínas mais acessíveis a proteases. Além disso, as células principais da mucosa gástrica secretam pepsina. Esta é liberada como um precursor inativo, o pepsinogênio, e é ativada por uma reação intramolecular (autoativação) em pH menor que 5 ou por uma pepsina ativa (autocatálise). Em pH acima de 2, o peptídio liberado permanece ligado à pepsina e atua como inibidor de sua atividade. Essa inibição termina ou quando há uma diminuição do pH para menos de 2 ou por ação adicional da pepsina. Os produtos da digestão das proteínas pela pepsina são grandes fragmentos peptídicos e alguns aminoácidos livres. Eles estimulam a liberação de colecistocinina no duodeno, o que, por

sua vez, ativa a liberação das principais enzimas digestivas pelo pâncreas, assim como a contração da vesícula biliar para liberar a bile.

As enzimas proteolíticas são liberadas pelo pâncreas como zimogênios inativos, de maneira similar ao pepsinogênio

A enteropeptidase duodenal converte o tripsinogênio em tripsina ativa. Essa enzima é, então, capaz de autoativação; além disso, ativa todos os outros zimogênios pancreáticos (quimotripsina, elastase e carboxipeptídios A e B). Devido a essa função primordial da tripsina na ativação de outras enzimas pancreáticas, sua atividade é controlada no pâncreas e nos ductos pancreáticos por um peptídio inibitório de baixo peso molecular.

As proteases pancreáticas clivam ligações peptídicas em diferentes localizações de uma proteína

A **tripsina** cliva as proteínas nos resíduos de arginina e lisina, a **quimotripsina** nos aminoácidos aromáticos e a **elastase** nos aminoácidos hidrofóbicos. O efeito combinado é a produção de uma abundância de aminoácidos livres e peptídios de baixo peso molecular, de 2-8 resíduos de comprimento. Em paralelo à secreção de proteases, o pâncreas também produz grandes quantidades de **bicarbonato de sódio**. Isso neutraliza o estômago, à medida que chegam ao duodeno, promovendo a atividade de proteases pancreáticas.

A digestão final de peptídios depende de peptidases do intestino delgado

A digestão final de di e oligopeptídios é efetuada no intestino delgado por endopeptidases, dipeptidases e aminopeptidases ligadas à membrana. Os produtos finais desse processo são aminoácidos livres e di e tripeptídios, que são absorvidos através da membrana do enterócito por transporte específico mediado por carreadores. No enterócito, os di e tripeptídios são posteriormente hidrolisados em seus aminoácidos constituintes. A etapa final é a transferência dos aminoácidos livres do enterócito para o sistema porta.



Quadro clínico

Abordagens diagnósticas à má absorção

A má absorção pode ser causada pela fibrose cística e por deficiência de lactase ou de outras enzimas digestivas específicas. A causa mais comum de má absorção de carboidratos é a deficiência de lactase. A insuficiência pancreática é também uma causa importante, assim como uma quantidade desadequada de bile. A má absorção pode igualmente resultar de danos na parede intestinal devido a, por exemplo, linfoma, doença inflamatória intestinal ou radioterapia. As intervenções cirúrgicas são causas importantes: gastrectomia, pancreatectomia e resseção de fragmentos grandes do intestino delgado.

Causas endócrinas raras incluem a síndrome de Zollinger-Ellison e a abetalipoproteinemia (uma disfunção rara do metabolismo de lipoproteínas, na qual a síntese de quilomícrons se encontra comprometida).

Os sinais de má absorção são a **diarreia crônica, a esteatorreia e a perda de peso,** e – nas crianças – **atrasos no crescimento.** Suas complicações resultam do aporte inadequado de nutrientes, vitaminas ou oligoelementos (Cap. 11).

O **diagnóstico de síndromes de má absorção** envolve testes de hematologia e bioquímica convencionais e a análise de processos inflamatórios ativos (proteína C reativa), assim como a análise de fezes e cultura de fezes. Os testes especializados incluem a análise de deficiências vitamínicas. É possível realizar pesquisas com base em imagiologia, como a ultrassonografia abdominal e a TC, e podem ser visualizadas porções do trato GI através de esôfago-gastroduodenoscopia. Podem ser colhidas biópsias do estômago, do duodeno e do intestino delgado.

Os testes do hidrogênio expirado são usados no diagnóstico da má absorção de carboidratos. Testes mais antigos para a má absorção incluem o teste de absorção de xilose e o teste de absorção de lactose. Se houver suspeita de insuficiência pancreática, é possível avaliar a excreção fecal de enzimas como a elastase e a lipase, e pode ser efetuada uma pancreatografia retrógada endoscópica (CPRE).



Quadro de conceitos avançados

Transporte ativo de aminoácidos para células epiteliais intestinais

Os mecanismos de transporte ativo de aminoácidos e de di e tripeptídios para as células epiteliais intestinais são semelhantes aos descritos para a glicose. Na membrana de borda em escova, simportes Na^+-dependentes que medeiam a absorção de aminoácidos estão ligados ao bombeamento de Na^+ ATP-dependente, para fora da membrana basolateral. Um simporte similar H^+-dependente está presente na superfície da borda em escova para o transporte ativo de di e tripeptídios para dentro da célula. Transportadores Na^+-independentes estão presentes na superfície basolateral, permitindo o transporte facilitado de aminoácidos para o sistema porta.

Foram identificados pelo menos seis sistemas específicos de simportes para a absorção de L-aminoácidos a partir do lúmen intestinal:

- Simporte de aminoácidos neutros com cadeias laterais curtas ou polares (Ser, Thr, Ala).
- Simporte de aminoácidos neutros com cadeias laterais aromáticas ou hidrofóbicas (Phe, Tyr, Met, Val, Leu, Ileu).
- Simporte de iminoácidos (Pro, OH-Pro).
- Simporte de aminoácidos básicos (Lys, Arg, Cys).
- Simporte de aminoácidos ácidos (Asp, Glu).
- Simporte de β-aminoácidos (β-Ala, Tau).

Esses sistemas de transporte estão também presentes nos túbulos renais, e defeitos

na sua estrutura molecular podem causar doenças (p. ex., **doença de Hartnup**, uma disfunção hereditária com problemas de absorção intestinal de aminoácidos e perda urinária de aminoácidos neutros, descrita no quadro da p. 84).

Resumo

- A digestão é uma série de processos que preparam os alimentos para a absorção.
- A absorção e a digestão de alimentos tornam os combustíveis metabólicos disponíveis para o organismo.
- Os carboidratos são digeridos em açúcares simples.
- As gorduras são hidrolisadas em di e monoglicerídios.
- As proteínas são hidrolisadas em di e tripeptídios e aminoácidos livres.
- Defeitos nesses mecanismos resultam em uma variedade de síndromes de má absorção e de intolerância alimentar.

Questões para aprendizagem

1. Descreva o processo de digestão do amido.
2. Discuta as possíveis complicações do vômito persistente.
3. Quais hormônios ajudam na digestão?
4. Liste os produtos da secreção do estômago.
5. Esboce os mecanismos do transporte de açúcares no intestino delgado.
6. Qual é o papel das micelas na digestão das gorduras?

Leituras sugeridas

Baumgart, D. C., Sandborn, W. J. Crohn's disease. *Lancet*. 2012; 380:1590–1605.

Binder, H. J. Causes of chronic diarrhea. *N Engl J Med*. 2006; 355:236–239.

Broer, A., Cavanaugh, J. A., Rasko, J. E.J., et al. The molecular basis of neutral aminoacidurias. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2006; 451:511–517.

Drozdowski, L. A. Thomson ABR: Intestinal sugar transport. *World J Gastroenterol*. 2006; 12:1657–1670.

Harris, J. B., LaRocque, R. C., Qadri, F., et al. Cholera. *Lancet*. 2012; 379:2466–2476.

Hou, W., Schubert ML. Gastric secretion. *Curr Opin Gastroenterol*. 2006; 22:593–598.

Kunzelmann, K., Mall, M. Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease. *Physiol Rev*. 2002; 82:245–289.

Sites

Diarrhoea: why children are still dying and what can be done, WHO 2009. www.who.int/maternal_child_adolescent/documents/9789241598415/en/index.html.

Johns Hopkins Children's Center. What is malabsorption. www.hopkinschildrens.org/tpl_rlinks_nav1up.aspx?id=5130.

Malabsorption. http://labtestsonline.org/understanding/conditions/malabsorption/.

MedlinePlus. Malabsorption. www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/000299.htm.

UNICEF rehydration solution 2006. www.unicef.org/media/media_31825.html.

CAPÍTULO 11

Vitaminas e Minerais

Marek H. Dominiczak and John I. Broom

Objetivos

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever vitaminas lipossolúveis e hidrossolúveis.
- Discutir as ações e as fontes das vitaminas.
- Discutir sinais e sintomas de deficiências vitamínicas.
- Descrever o papel dos oligoelementos no metabolismo.

Introdução

As vitaminas e os oligoelementos são micronutrientes essenciais ao metabolismo

Eles formam grupos prostéticos de enzimas ou funcionam como seus cofatores. Participam do metabolismo de carboidratos, gordura e proteínas. Algumas vitaminas (A e D) atuam como hormônios. Tanto as vitaminas quanto os oligoelementos são importantes para o crescimento, proliferação e diferenciação celulares, e muitos afetam os fenômenos imunes. A necessidade de vitaminas depende, até certo ponto, da ingestão de macronutrientes (Cap. 22).

A deficiência de um micronutriente pode ocorrer devido a ingestão inadequada, baixa absorção a partir do trato intestinal, utilização ineficiente ou perda aumentada, ou demanda aumentada. Tais deficiências levam a síndromes clínicas específicas. Essas podem se desenvolver como um componente da má nutrição geral, podem ser elas mesmas uma causa de doença, ou podem ocorrer em períodos de demanda aumentada, como a gravidez ou o surto de crescimento na adolescência. Em idade avançada, as deficiências podem estar associadas a uma absorção intestinal menos eficiente (Cap. 10). Também podem ser complicações da cirurgia gastrintestinal. As deficiências múltiplas de micronutrientes são muito mais comuns do que as de micronutrientes únicos.

Os oligoelementos e algumas vitaminas são tóxicos quando em excesso

Os oligoelementos como o cádmio, o mercúrio e o alumínio são introduzidos na cadeia alimentar e são citotóxicos. Oligoelementos essenciais, como, por exemplo, o cobre e o manganês, podem também ser tóxicos quando em excesso. Para avaliação da toxicidade de oligoelementos, pode ser necessário analisar tecidos além do sangue antes de ser possível um diagnóstico de intoxicação por metais.

As vitaminas dividem-se em vitaminas lipossolúveis e vitaminas hidrossolúveis

As vitaminas lipossolúveis são a A, D, E e K, e as vitaminas hidrossolúveis são a B_1, B_2, B_3, B_5, B_6, B_{12}, folato, biotina e vitamina C.

A avaliação dos níveis de micronutrientes é difícil por várias razões

As medições das concentrações plasmáticas de vitaminas são inapropriadas no caso das vitaminas hidrossolúveis, uma vez que esses níveis se relacionam com a ingestão recente e não refletem o estado geral do organismo. Em tais casos, a determinação da atividade de enzimas associadas a vitaminas particulares tem sido mais adequada. Isso é geralmente efetuado como um teste de estimulação: a atividade de uma enzima é medida na ausência e na presença de uma vitamina sob teste. É identificado um déficit se a atividade da enzima for estimulada na presença de enzima adicionada.

Por último, uma diminuição na concentração de um nutriente no sangue ou plasma não indica necessariamente uma deficiência; pode ser simplesmente o reflexo de uma resposta metabólica ao estresse ou de uma alteração no estado fisiológico, como a gravidez.

Vitaminas lipossolúveis: A, D, E, K

As vitaminas lipossolúveis são armazenadas nos tecidos

As vitaminas lipossolúveis se encontram associadas à gordura corporal e são frequentemente armazenadas nos tecidos, sendo suas concentrações circulantes mantidas relativamente constantes. Por exemplo, a vitamina A é armazenada no fígado e transportada no plasma por proteínas de ligação específicas. As vitaminas lipossolúveis não são absorvidas na dieta tão prontamente quanto as vitaminas hidrossolúveis, mas por outro lado quantidades consideráveis são armazenadas nos tecidos. Com exceção da vitamina K, elas não atuam como coenzimas: as vitaminas A e D se comportam como hormônios. As vitaminas A e D, mas não as vitaminas E ou K, podem ser tóxicas quando em excesso.

Vitamina A

"Vitamina A" é um termo genérico para **retinol, retinal e ácido retinoico,** todos encontrados em animais. O retinal e o ácido retinoico são as formas ativas da vitamina A.

O termo “retinoides” tem sido usado para definir estas três substâncias, assim como outros compostos sintéticos associados a atividades semelhantes à vitamina A.



Quadro clínico

Causas da má absorção de gorduras

A má absorção de gorduras pode conduzir a deficiências das vitaminas A, D, E e K. Pode ocorrer como consequência de doenças hepáticas ou da vesícula biliar, doença inflamatória intestinal (doença de Crohn, doença celíaca) e fibrose cística.

A provitamina da vitamina A é o pigmento vegetal **β-caroteno** e outros carotenoides. O β-caroteno é convertido no intestino delgado em *todo-trans*-retinal pela ação da β-caroteno dioxigenase. O metabolismo subsequente realizado nos enterócitos produz retinol e ácido retinoico, que são transportados para o fígado para armazenamento (Fig. 11.1). O β-caroteno é hidrossolúvel e se encontra presente em alimentos vegetais. Os vegetais verde-escuros e amarelos e os tomates são boas fontes de β-caroteno.

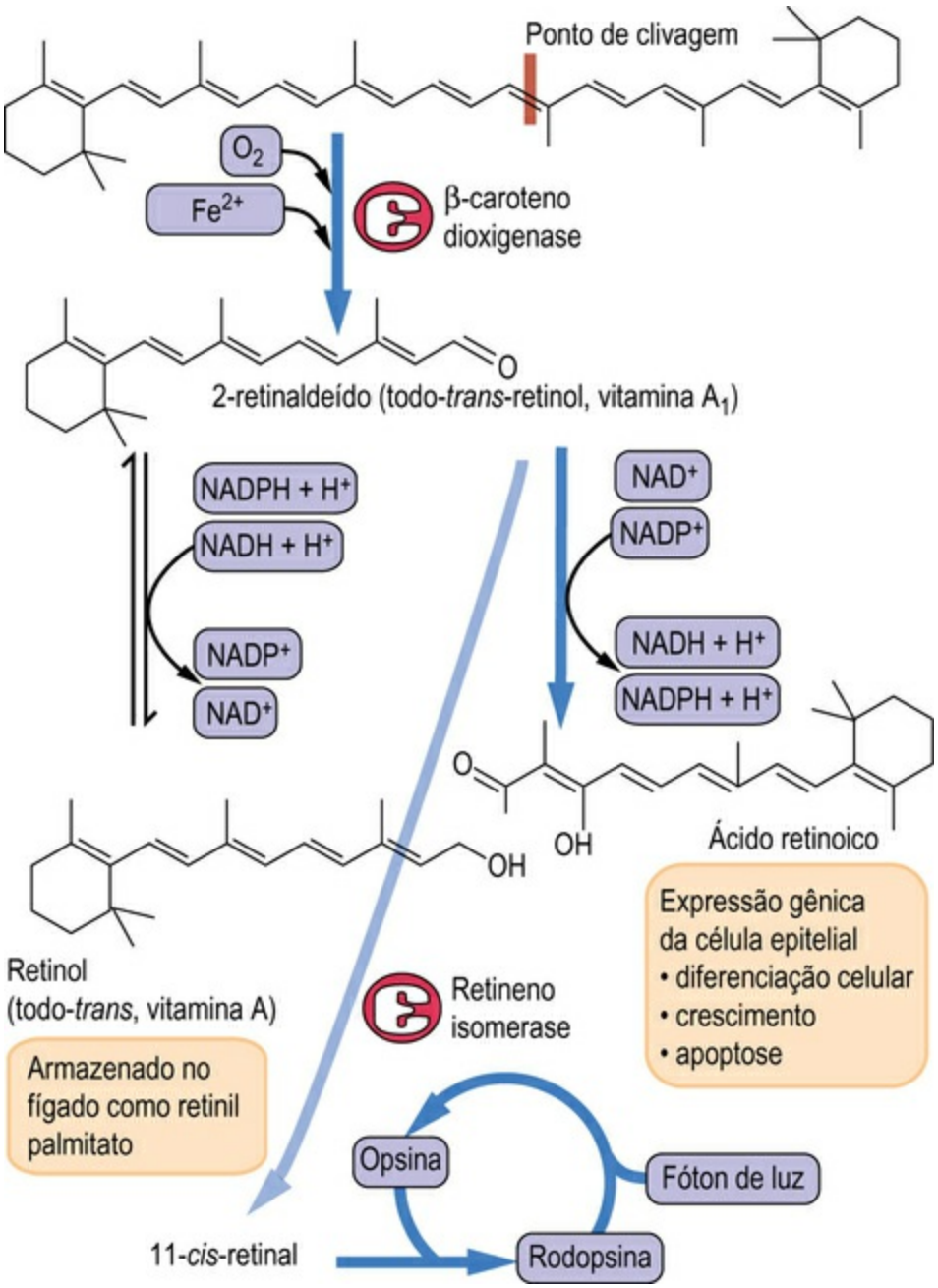


FIG. 11.1 Estrutura, metabolismo e função da vitamina A.
A conversão do retinaldeído em ácido retinoico é irreversível. (Consultar também o Cap. 40.)
Reproduzido a partir de Dominiczak MH. Medical Biochemistry Flash Cards. London: Elsevier, 2012, Card 39.

Todas as formas de vitamina A provenientes da dieta são convertidas em retinol

Todas as formas de vitamina A provenientes da dieta são convertidas em retinol. A conversão dos carotenoides em vitamina A raramente é 100% eficiente e a potência dos alimentos é descrita em equivalentes de atividade de retinol (RAE); 1 μg de retinol é equivalente a 12 μg de β-caroteno, ou 24 μg de outros carotenos. Por sua vez, o retinol pode ser convertido em retinal e ácido retinoico. Fígado, óleo de peixe, gema de ovo, manteiga e leite são boas fontes de retinol e ácido retinoico pré-formados.

A vitamina A é armazenada no fígado e precisa ser transportada aos seus locais de ação

A vitamina A é armazenada no fígado na forma de retinol e ésteres de retinol (palmitato

de retinol), ligada às proteínas citosólicas de ligação do retinol (CRBP, do inglês *cytosolic retinol-binding proteins*). As reservas hepáticas suprem as necessidades por aproximadamente um ano. O retinol é secretado pelo fígado ligado à proteína sérica de ligação ao retinol (RBP, do inglês *retinol binding protein*). Pensa-se que o ácido retinoico seja transportado para as células tanto ligado à albumina quanto à proteína específica de ligação ao ácido retinoico (RABP, do inglês *retinoic acid-binding protein*). O retinol é captado pelas células através de um receptor de membrana.

O ácido retinoico é uma molécula sinalizadora. Ele interage com fatores de transcrição ativados por ligantes, conhecidos como receptores retinoides nucleares. Os receptores de ácidos retinoides (RAR, do inglês *retinoid acid receptors*) se ligam ao todo-*trans* e 9-*cis*-ácido retinoico, enquanto os chamados receptores rexinoides (RXR) se ligam somente ao isômero 9-*cis*. Esses receptores podem formar heterodímeros. Receptores do tipo RXR podem também interagir com outros receptores nucleares, como aqueles da vitamina D_3, hormônios tireoidianos ou receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPARs, do inglês *peroxisome proliferator-activated receptors*). O ácido retinoico também tem um papel no crescimento e diferenciação das células, incluindo as do sistema nervoso central.

A deficiência de vitamina A se apresenta como cegueira noturna

A vitamina A é um componente do pigmento visual rodopsina, que é encontrado nos bastonetes da retina e é formado pela ligação do 11-*cis*-retinal à apoproteína opsina. Quando a rodopsina é exposta à luz, ela é clareada; o retinal se dissocia, sendo isomerizado e reduzido a todo-*trans*-retinol (Fig. 11.1). Esta reação é acompanhada de uma mudança conformacional que desencadeia um impulso nervoso percebido pelo cérebro como luz. Os bastonetes são responsáveis pela visão com pouca luz.

A deficiência de vitamina A se apresenta como **visão noturna anormal ou cegueira noturna** (é o sintoma mais comum de deficiência de vitamina A em crianças e grávidas). Dado que a vitamina A afeta o crescimento e a diferenciação das células epiteliais, sua deficiência produz epitelização anormal e xeroftalmia (córnea mole e opaca). A deficiência grave de vitamina A leva à cegueira permanente. A deficiência de vitamina A é a causa mais comum de cegueira no mundo.

A deficiência subclínica pode também causar maior suscetibilidade a infecções. A deficiência grave de vitamina A ocorre principalmente nos países em desenvolvimento, mas também é bastante comum em pacientes com doença hepática grave ou má absorção lipídica (p. ex., fibrose cística).

As mulheres grávidas ou lactantes também são suscetíveis à deficiência de vitamina A. O grupo mais vulnerável são os bebês prematuros e, nos países em desenvolvimento, os bebês amamentados por mães que têm, elas próprias, deficiência de vitamina A.

A vitamina A em excesso é tóxica

A vitamina A em excesso é tóxica, com sintomas que incluem pressão intracraniana aumentada, dores de cabeça, visão dupla, tonturas, dores ósseas e articulares, perda de cabelo, dermatite, hepatoesplenomegalia, diarreia e vômito. É virtualmente impossível

desenvolver toxicidade por vitamina A a partir da ingestão normal de alimentos; no entanto, a toxicidade pode resultar do uso de suplementos de vitamina A. O aumento da ingestão de vitamina A também está associado à teratogenicidade e deve ser evitado durante a gravidez.

Vitamina D

A vitamina D (calcitriol) é um hormônio. É um grupo de esteróis muito relacionados produzidos pela ação da luz ultravioleta (comprimento de onda de 290-310 nm) sobre provitaminas (ergosterol em plantas e 7-deidrocolesterol em animais). O 7-deidrocolesterol é sintetizado no fígado e encontrado na pele. Os produtos da reação fotolítica são o ergocalciferol (vitamina D_2) e o colecalciferol (vitamina D_3). Eles são equipotentes e ambos convertidos em uma série de derivados hidroxilados, no fígado, em 25-hidroxicolecalciferol ($25(OH)D_3$; calcidiol) e posteriormente, nos rins, no composto ativo 1α-,25-di-hidroxicolecalciferol ($1,25(OH)_2D_3$; calcitriol). O metabolismo e a ação da vitamina D são descritos no Capítulo 26.

A vitamina D também influencia genes envolvidos na proliferação, diferenciação e apoptose celular. Ela modula o crescimento, participa na função imune e é anti-inflamatória.

A vitamina D é a única vitamina que não é geralmente necessária na dieta

A ingestão de vitamina D é necessária apenas em condições em que a exposição à luz solar é inadequada. A maior parte da ingestão é feita através do leite e outros alimentos enriquecidos. O óleo de peixe, a carne bovina, a gema de ovo e o fígado também são ricos em vitamina D. As demandas são maiores no inverno devido à menor exposição à luz solar.

A deficiência de vitamina D produz raquitismo em crianças e osteomalácia em adultos

A deficiência de vitamina D pode ser causada por exposição insuficiente à luz solar ou metabolismo aumentado da vitamina D devido à baixa ingestão ou absorção de cálcio. A deficiência pode também desenvolver-se na doença renal e por má absorção de gorduras (na fibrose cística, doença de Crohn e após *bypass* gástrico).

O **raquitismo** é caracterizado por ossos moles e flexíveis, devido a uma mineralização defeituosa secundária à deficiência de cálcio. Ocorre o característico arqueamento das pernas e a formação do "rosário raquítico" em torno das junções costocondrais. No adulto, ocorre a desmineralização dos ossos preexistentes, aumentando a suscetibilidade a fraturas. A deficiência de vitamina D é também caracterizada por baixas concentrações circulantes de cálcio e atividade aumentada da fosfatase alcalina sérica (Cap. 26).

A vitamina D em excesso é tóxica

O excesso de vitamina D causa aumento da absorção de cálcio e da reabsorção óssea, levando a hipercalcemia e deposição metastática de cálcio. Os sintomas são anorexia,

perda de peso e poliúria. Existe também uma tendência a desenvolver cálculos renais devido à hipercalciúria secundária à hipercalcemia.

Vitamina E

A vitamina E da dieta é uma mistura de diversos compostos chamados tocoferóis. Noventa por cento da vitamina E presente nos tecidos humanos está na forma do isômero natural, α-tocoferol (Fig. 11.2). Está envolvida na função imune, assim como na sinalização celular e expressão gênica. O α-tocoferol inibe a atividade da proteína cinase C (PKC) e afeta a adesão celular, bem como o metabolismo do ácido araquidônico. Na cultura europeia, a vitamina E foi associada à fertilidade e à atividade sexual. Isso é certamente verdade em outras espécies animais, nas quais a vitamina E tem um papel na produção de espermatozoides e na implantação do óvulo, mas não é o caso da espécie humana. Ela é absorvida da dieta, no intestino delgado, junto com os lipídios, e não existe proteína transportadora específica. É empacotada nos quilomícrons e, na circulação, encontra-se associada a lipoproteínas.

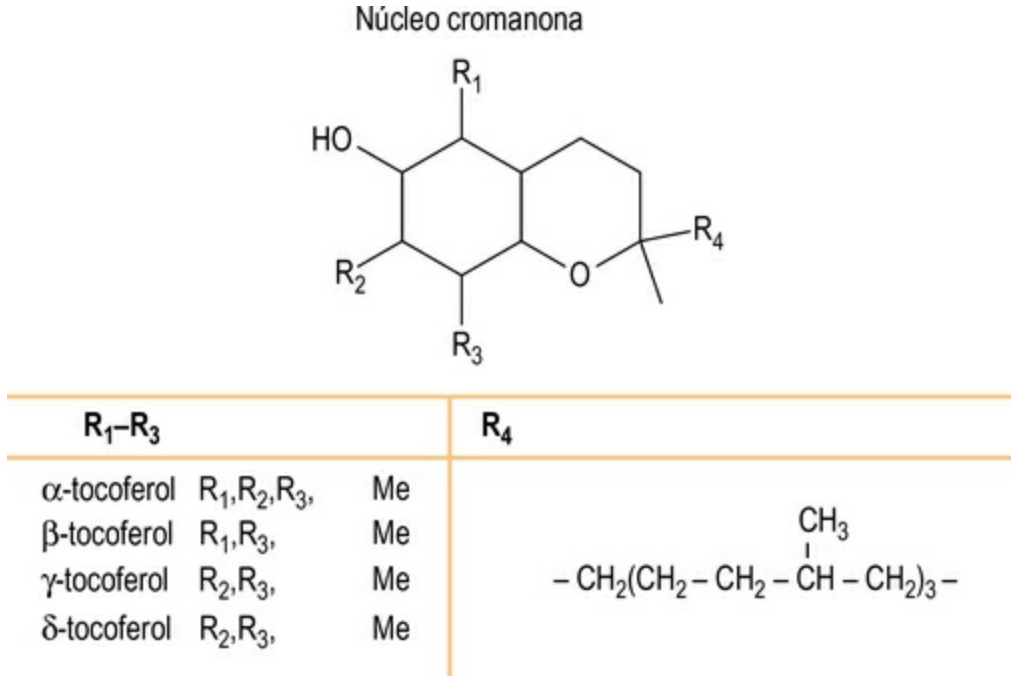


FIG. 11.2 Estrutura da família da vitamina E (tocoferóis).
R_1-R_3 podem ser metilados em uma variedade de combinações. R_4 é uma cadeia de poli-isoprenoide. Me, metil.

A vitamina E é um antioxidante membranar

A vitamina E é o antioxidante natural mais abundante, e, devido à sua solubilidade em lipídios, está associada a todas as estruturas que os contêm: membranas, lipoproteínas e depósitos de gordura (Fig. 37.9). Ela protege os lipídios da oxidação por espécies reativas de oxigênio.

As fontes naturais mais ricas em vitamina E são os óleos vegetais, frutos secos e também os vegetais verde-escuros.

A má absorção de gorduras reduz a absorção de vitamina E

Além da má absorção de gorduras, a abetalipoproteinemia pode causar deficiência de vitamina E. A deficiência pode ser resultado de baixa ingestão de vitamina E na gravidez e em recém-nascidos (principalmente em bebês prematuros alimentados com fórmulas lácteas com baixo conteúdo de vitamina E). A deficiência desta vitamina em prematuros causa **anemia hemolítica, trombocitose e edema, assim como neuropatia periférica, miopatia e ataxia.** Existe pouca evidência suportando a toxicidade por vitamina E.

Vitamina K

A vitamina K é um grupo de compostos cujo número de unidades de isoprenoides varia em sua cadeia lateral. A vitamina K circula como filoquinona (vitamina K_1), e suas reservas hepáticas estão na forma de menaquinonas (vitamina K_2). A estrutura, nomenclatura e fontes de vitamina K encontram-se esquematizadas na Figura 11.3. A absorção da vitamina K depende da capacidade de absorver gordura.

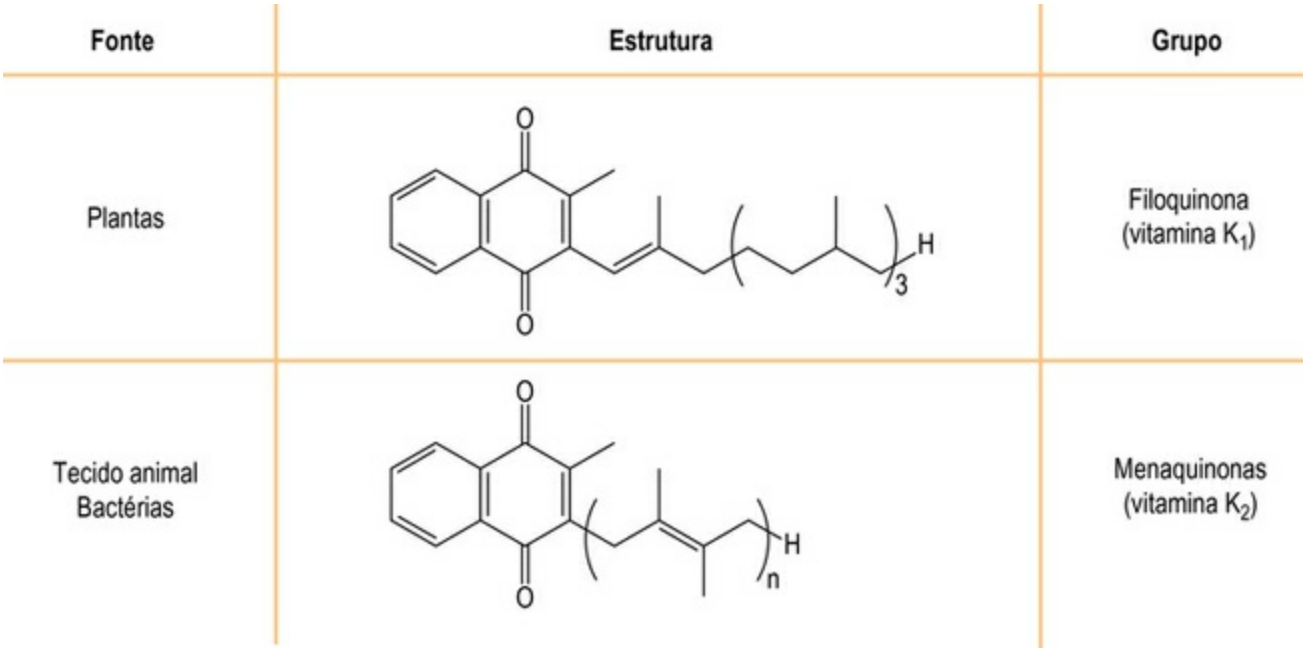


FIG. 11.3 Estruturas das diferentes formas da vitamina K.

A vitamina K é necessária à coagulação sanguínea

A vitamina K é necessária às modificações pós-traducionais dos fatores de coagulação (fatores II, VII, IX e X; Fig. 7.3). Todas essas proteínas são sintetizadas pelo fígado como precursores inativos e são ativadas pela carboxilação de resíduos específicos de ácidos glutâmicos (Glu) por uma enzima dependente de vitamina K (Fig. 11.4). A protrombina (fator II) contém dez destes resíduos carboxilados e todos são necessários nessa proteína para a quelação específica de íons Ca^{2+} durante sua função no processo de coagulação. Recentemente, outras proteínas contendo resíduos Glu dependentes de vitamina K, como a osteocalcina, foram identificadas nos tecidos.

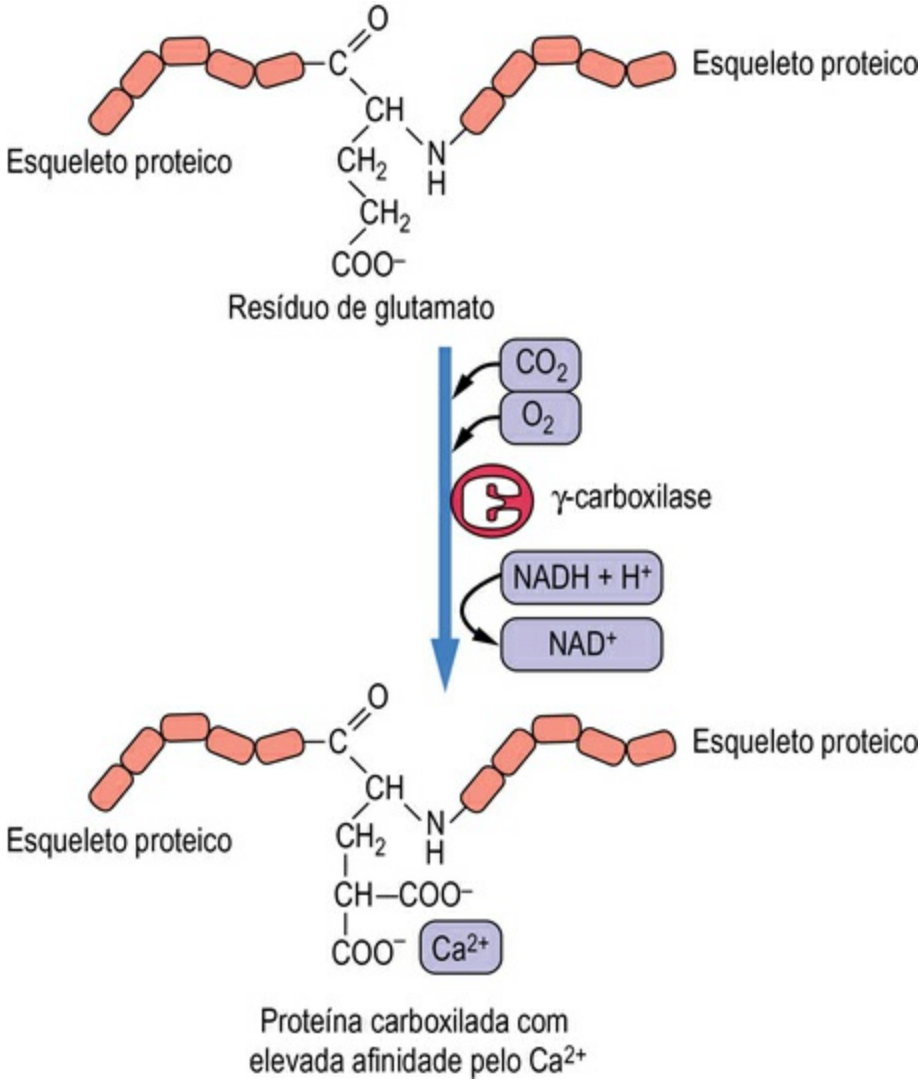


FIG. 11.4 Carboxilação de resíduos de glutamato intermediada pela vitamina K. Os resíduos carboxilados são necessários para a quelação do Ca^{2+}.

A vitamina K está amplamente distribuída na natureza: suas fontes dietéticas são vegetais de folhas verdes, frutas, laticínios, óleos vegetais e cereais. A vitamina K também é produzida pela microflora intestinal.

A deficiência de vitamina K causa distúrbios na coagulação sanguínea

A produção de vitamina K pela flora intestinal garante que a deficiência praticamente não ocorra no homem, exceto em recém-nascidos. Em casos raros, pode ocorrer em doentes hepáticos ou com má absorção de gorduras. A deficiência está associada a distúrbios na coagulação sanguínea.

As crianças prematuras estão especialmente em risco de deficiência e podem desenvolver a doença hemorrágica do recém-nascido

A transferência placentária de vitamina K para o feto é ineficiente. Imediatamente após o nascimento, a concentração circulante diminui. Normalmente, ela se recupera pela absorção de alimentos, mas isso pode ser demorado em prematuros. Além disso, o trato intestinal do recém-nascido é estéril e, dessa forma, não haverá fonte de vitamina K durante vários dias após o nascimento.

Inibidores da ação da vitamina K são valiosos fármacos antitrombóticos

Inibidores específicos da carboxilação dependente de vitamina K são usados no tratamento de doenças relacionadas com a trombose, por exemplo nos pacientes com **trombose venosa profunda** e **tromboembolismo pulmonar,** ou naqueles com **fibrilação atrial** com risco de trombose. Esses são os fármacos do grupo dos dicumarínicos, como a **varfarina,** que inibem a ação da vitamina K (Cap. 7). A varfarina também é usada como veneno de rato, e a vitamina K é o antídoto para a intoxicação humana por esse agente.

Vitaminas hidrossolúveis B, C

Com exceção da vitamina B_{12}, o organismo não possui capacidade para armazenar as vitaminas hidrossolúveis. Em consequência disso, elas devem ser regularmente fornecidas pela dieta. Qualquer excesso é excretado na urina. Ao contrário das vitaminas lipossolúveis, não existe toxicidade associada às vitaminas do complexo B.

Vitaminas do complexo B

As vitaminas do complexo B são essenciais ao metabolismo normal e funcionam como coenzimas em várias reações do metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas. Quanto maior a ingestão calórica, maior a necessidade de vitaminas do complexo B. O fornecimento aumentado de energia, particularmente a partir de carboidratos, requer quantidades aumentadas de vitaminas do complexo B. As doenças associadas a maior demanda calórica implicam uma maior ingestão de tiamina e de outras vitaminas do complexo B. Assim, o beribéri (ver a seguir) pode se desenvolver em uma dieta rica em carboidratos.

Tiamina (vitamina B_1)

A tiamina é essencial para reações de carboxilação

A tiamina é importante para o metabolismo de carboidratos. Em sua forma nativa, tiamina-pirofosfato (TPP), é uma coenzima da piruvato desidrogenase (a enzima E1 do complexo CPD, Cap. 14). Ela participa em uma reação similar de descarboxilação do α-cetoglutarato, assim como no metabolismo de aminoácidos de cadeia ramificada. É também uma coenzima para a reação da transcetolase na via das pentoses fosfato (Cap. 12), e é importante na produção de ácido clorídrico no estômago.

O beribéri foi a primeira "doença de deficiência" a ser descoberta

A deficiência grave de tiamina resulta em **beribéri "seco" (sem retenção de fluidos) ou "úmido"** (associado à insuficiência cardíaca com edema). O beribéri é caracterizado primariamente por sintomas neuromusculares e ocorre em populações que contam apenas com arroz polido como alimento. Os sinais e sintomas da deficiência podem ser igualmente observados nos idosos e nos grupos de baixo rendimento com dieta pobre.

A deficiência de tiamina está associada ao alcoolismo

A depleção de tiamina pode ocorrer rapidamente (em uma questão de aproximadamente 14 dias). Os sintomas iniciais da deficiência de tiamina são perda de apetite, obstipação e náuseas. Eles podem progredir para depressão, neuropatia periférica e tremores. A deterioração adicional resulta em confusão mental (perda da memória recente), ataxia e perda da coordenação ocular. Esta combinação, frequentemente observada em pacientes alcoólatras, é a psicose de Wernicke-Korsakoff. O beribéri úmido é particularmente associado ao alcoolismo.

Os testes usados para detectar os níveis de tiamina incluem sua medição direta por cromatografia líquida de alta pressão e a medição "clássica" da atividade da transcetolase eritrocitária.

Riboflavina (vitamina B_2)

A riboflavina está associada às oxidorredutases

A riboflavina está ligada ao açúcar álcool ribitol. A molécula é corada, fluorescente, fotolábil e termoestável. É encontrada em oxidorredutases como a flavina mononucleotídio (FMN) e a flavina adenina dinucleotídio (FAD), e é necessária ao metabolismo energético tanto de açúcares quanto de lipídios (Cap. 9).

A falta de riboflavina na dieta causa uma síndrome de deficiência com inflamação dos cantos da boca (estomatite angular), da língua (glossite) e dermatite de descamação. Também pode se desenvolver fotofobia. Devido à sua sensibilidade à luz, a deficiência de riboflavina pode ocorrer em recém-nascidos com icterícia, os quais são tratados com fototerapia. Igualmente, sabe-se que o hipotireoidismo também afeta a conversão de riboflavina em FMN e FAD.

Para determinar os níveis de riboflavina, é medida a atividade da glutationa redutase eritrocitária.

Niacina (vitamina B_3)

A niacina é necessária à síntese de NAD^+ e $NADP^+$

A niacina é um nome genérico para ácido nicotínico ou nicotinamida, e ambos são nutrientes essenciais. A niacina é ativa enquanto parte da coenzima nicotinamida adenina dinucleotídio (NAD^+) e da nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato ($NADP^+$), as quais participam em reações catalisadas por oxidorredutases. A forma ativa da vitamina necessária para a síntese de NAD^+ e $NAPD^+$ é o nicotinato, e, portanto, a nicotinamida deve ser deamidada antes de se tornar disponível para a síntese dessas coenzimas. A niacina pode ser sintetizada a partir do triptofano e, portanto, não é uma vitamina no verdadeiro sentido da palavra. A conversão é, contudo, muito ineficiente e não consegue suprir quantidades suficientes de niacina. Além disso, a conversão requer tiamina, piridoxina e riboflavina e, em dietas pobres, tal síntese seria problemática. As exigências de niacina estão também relacionadas com o gasto energético.

A deficiência grave de niacina ocasiona dermatite, diarreia e demência

A deficiência de niacina produz inicialmente glossite superficial, mas pode progredir para **pelagra,** que é caracterizada por dermatite, lesões de pele semelhantes a queimaduras solares nas áreas corporais expostas ao sol e à pressão, assim como diarreia e demência. A pelagra é fatal, se não tratada. Alguns fármacos, como, por exemplo, o medicamento antituberculose isoniazida, predispõem-se para a deficiência de niacina. No mundo moderno, a pelagra é considerada uma raridade médica.

Por outro lado, doses muito elevadas de niacina podem causar hepatotoxicidade, que é reversível com a retirada da vitamina.

Piridoxina (vitamina B_6)

A piridoxina é importante para o metabolismo de aminoácidos

A vitamina B_6 é uma mistura de piridoxina (um álcool), piridoxal (um aldeído), piridoxamina e seus ésteres 5'-fosfato. A piridoxina é a principal forma da vitamina B_6 na dieta, e o piridoxal fosfato é sua forma ativa. É absorvida no jejuno. Durante a absorção, ocorre alguma hidrólise do fosfato. A maioria dos tecidos, contudo, contém piridoxal cinase, que ressintetiza as formas fosforiladas necessárias à síntese, catabolismo e interconversão de aminoácidos (Cap. 19).

A necessidade de piridoxina aumenta com a ingestão elevada de proteínas

O piridoxal fosfato e a piridoxamina estão envolvidos em mais de 100 reações do metabolismo dos carboidratos (incluindo a reação da glicogênio fosforilase), dos lipídios e particularmente dos aminoácidos, assim como do metabolismo de unidades com um carbono (Fig. 19.2). A piridoxina é necessária para a síntese dos neurotransmissores serotonina e noradrenalina (Cap. 41.1), além da síntese de esfingosina, um componente da esfingomielina e dos esfingolipídios (Cap. 28). É também necessária para a síntese do grupo heme (Cap. 30) e influencia a função imune. Devido ao seu papel no metabolismo de aminoácidos, as necessidades de vitamina B_6 aumentam com o aumento da ingestão de proteínas.

A vitamina B_6 está presente em uma grande variedade de alimentos, como peixe, carne bovina, fígado, aves, bem como em batatas e frutas (mas não citrinos).

A deficiência de vitamina B_6 causa sintomas neurológicos e anemia

A deficiência de vitamina B_6, em sua forma mais branda, causa irritabilidade, nervosismo e depressão, progredindo para neuropatia periférica, convulsões e coma na deficiência grave. A deficiência grave está associada também à anemia sideroblástica (anemia caracterizada pela presença de eritrócitos nucleados com grânulos de ferro). Ocorrem também dermatite, queilose e glossite. Observam-se níveis baixos no **alcoolismo, obesidade** e em **estados de má absorção** (doença de Crohn, doença celíaca e colite ulcerosa), assim como na **doença renal terminal** e em **condições autoimunes.**

A isoniazida, por se ligar à piridoxina, bem como à pílula contraceptiva, por aumentar a

síntese de enzimas que requerem a vitamina, pode precipitar a deficiência. O debate em relação à pílula contraceptiva continua, mas geralmente se aceita que haja um aumento da necessidade de ingestão de piridoxina.

A avaliação dos níveis de piridoxina é baseada na medição dos níveis da enzima aspartato aminotransferase eritrocitária.

Biotina

A biotina é importante para reações de carboxilação

A biotina funciona como coenzima em complexos multienzimáticos envolvidos em reações de carboxilação (Fig. 14.4). Ela é importante na lipogênese, na gliconeogênese e no catabolismo de aminoácidos de cadeias ramificadas.

A biotina é normalmente sintetizada pela flora intestinal, e isso satisfaz grande parte das necessidades do organismo.

Os sintomas da deficiência de biotina incluem depressão, alucinações, dor muscular e dermatite. Crianças com múltiplas deficiências das enzimas descarboxilases também desenvolvem imunodeficiência. O consumo de ovos crus pode causar deficiência de biotina, uma vez que a proteína da clara do ovo, a avidina, se combina com a biotina, impedindo sua absorção.

Vitamina B_{12}

A vitamina B_{12} é parte da estrutura do grupo heme

A vitamina B_{12} (cobalamina) tem uma estrutura complexa em anel similar à porfirina do grupo heme (Cap. 30), mas é mais hidrogenada. O ferro localizado no centro do anel do grupo heme é substituído por um íon cobalto (Co^{3+}). Esta é a única função conhecida do cobalto no organismo. Além disso, um anel de dimetilbenzimidazol faz também parte da molécula ativa (é essencial para a quelação do íon cobalto; Fig. 11.5).

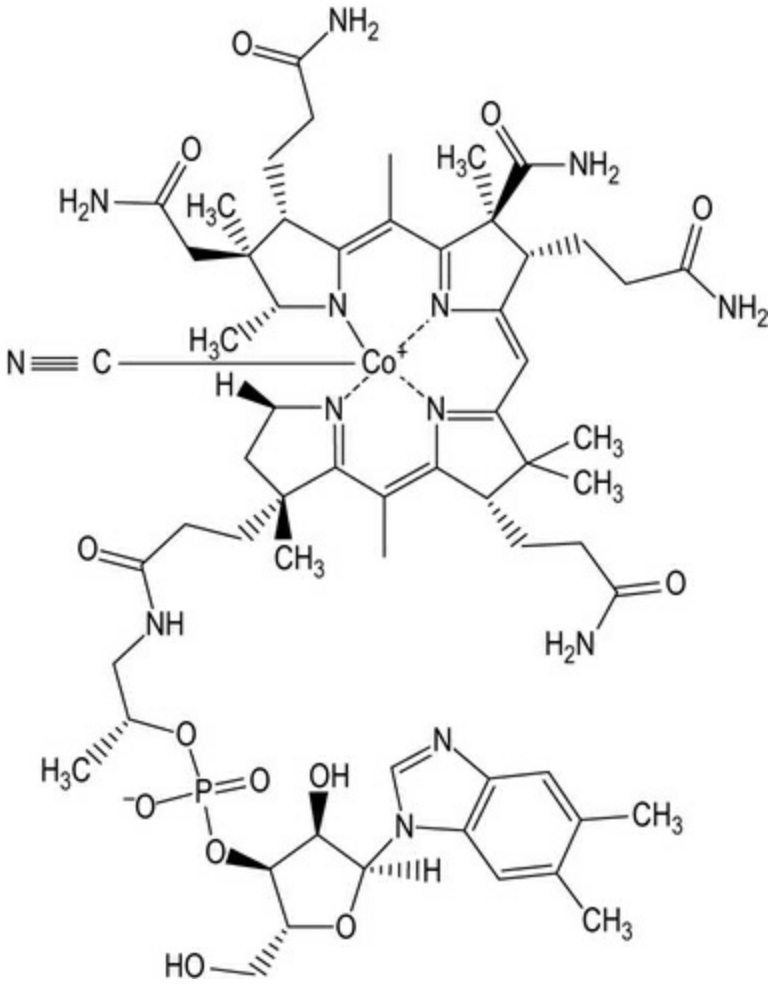


FIG. 11.5 Vitamina B_{12}.
Existe um grupo ciano (CN) ligado ao cobalto: esse é um artefato de extração, mas é também a forma mais estável da vitamina, e é, de fato, o produto comercialmente disponível. O grupo ciano precisa ser removido para a conversão na forma ativa da vitamina.

A vitamina B_{12} participa da síntese de ácidos nucleicos, da produção de eritrócitos, bem como da reciclagem de folatos. Em conjunto com o folato e a vitamina B_6, ela controla o metabolismo da homocisteína, no qual é um cofator para a metionina sintetase, que converte a homocisteína em metionina. Participa da síntese da molécula doadora de grupos metil, a S-adenosilmetionina. A vitamina B_{12} é necessária em apenas uma outra reação, a da l-metilmalonil-CoA mutase, que converte metilmalonil-CoA em succinil-CoA. A forma de coenzima da vitamina, neste caso, é a 5′-desoxi adenosilcobalamina.

A vitamina B_{12} requer o fator intrínseco para sua absorção

Existem mecanismos específicos para a absorção e o transporte da cobalamina (Fig. 11.6). A cobalamina é liberada dos alimentos por uma protease gástrica e pelo HCl. Está ligada ao fator intrínseco secretado pelas células parietais no estômago, e é absorvida no íleo distal por endocitose mediada por receptores. A vitamina B_{12} é excretada na bile, e existe acentuada circulação êntero-hepática.

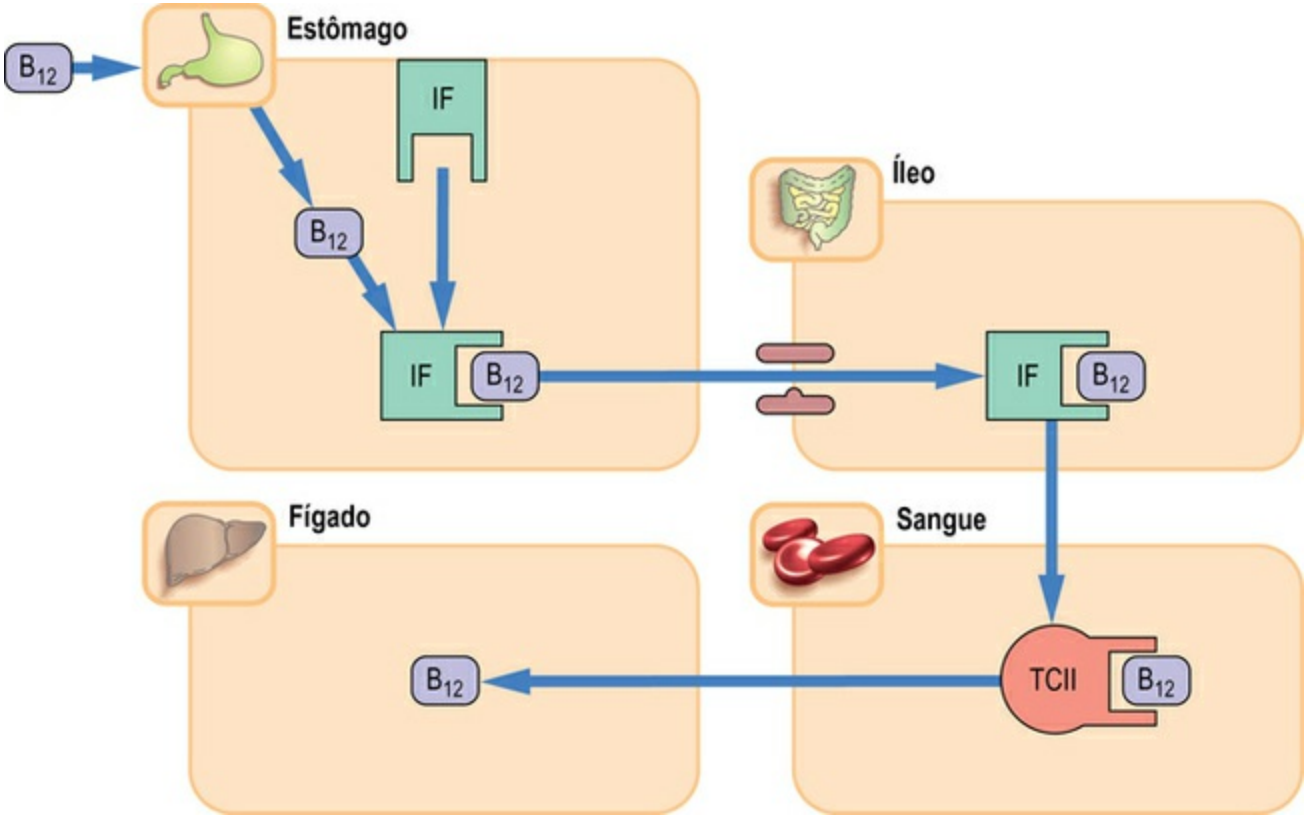


FIG. 11.6 Digestão, absorção e transporte da vitamina B_{12}.
A difusão simples da vitamina B_{12} livre através da membrana intestinal representa 3% do transporte vitamínico, e a formação do complexo com o fator intrínseco (IF) é responsável por 97%. Os derivados da vitamina B_{12} são liberados pelos alimentos a partir da digestão peptídica no estômago e se ligam ao IF secretado pelas células parietais da mucosa gástrica. O complexo IF-B_{12} liga-se a sítios receptores específicos presentes na mucosa do íleo. O fator limitante da taxa de absorção da vitamina B_{12} é o número de sítios receptores presentes no íleo. Outras proteínas de transporte, transcobalamina I, II e III (TC I, II e III) e proteínas R, estão envolvidas no transporte ou armazenamento das cobalaminas. Estas últimas são liberadas pelas glândulas salivares e pela mucosa gástrica.

A vitamina B_{12} está apenas presente em produtos animais

A vitamina B_{12} é sintetizada somente por bactérias. Está ausente em todas as plantas, mas concentrada no fígado dos animais em três formas: metilcobalamina, adenosilcobalamina e hidroxicobalamina. É encontrada apenas em produtos animais, como peixe, laticínios, carnes, e particularmente em órgãos como o fígado e o rim. No passado, o fígado era usado no tratamento de estados de deficiência. Os cereais enriquecidos do café da manhã também contêm esta vitamina. Os veganos estão, por isso, em risco de desenvolverem uma deficiência dietética de vitamina B_{12}.

A deficiência de vitamina B_{12} causa anemia perniciosa

A deficiência de vitamina B_{12} é caracterizada por anemia, fadiga, constipação, perda de peso, diarreia e sintomas neurológicos, como dormência e sensação de formigueiro, perda de equilíbrio, confusão, perturbações de humor e demência. A deficiência pode ocorrer através de vários mecanismos. O mais comum é a anemia perniciosa, uma condição autoimune que resulta em atrofia gástrica e na falta do fator intrínseco, que

evita a absorção da vitamina no íleo terminal. A anemia perniciosa afeta 1-3% dos adultos mais velhos. A carência de fator intrínseco pode ser causada também por cirurgia gástrica e por cirurgia bariátrica (para perda de peso). Uma situação similar, ainda que causada por um mecanismo diferente, ocorre em função da remoção cirúrgica do íleo, como, por exemplo, na doença de Crohn (Cap. 10).

A deficiência também pode ser causada por hipocloridria associada à idade (Tabela 11.1).

Tabela 11.1

Causas da deficiência de vitamina B_{12}

Mecanismo	Tempo para desenvolver deficiência clínica (anos)
Dieta vegana	10-12
Falha do fator intrínseco	1-4
Disfunção do íleo	Rápido

Quadro de conceitos avançados

Proteínas transportadoras da vitamina B_{12}

O fator intrínseco (IF) é uma glicoproteína. Outras proteínas de ligação à cobalamina, as proteínas R, secretadas pelas glândulas salivares e pelo estômago, também são glicoproteínas e, em conjunto com as transcobalaminas (TC) I e III, são chamadas de cobalafilinas. O terceiro tipo de proteína, também uma glicoproteína, é a TCII. Todas as três classes de proteínas transportadoras de vitamina B_{12} são polipeptídios de uma única cadeia (340-375 resíduos de aminoácidos) e têm um único sítio de ligação para a cobalamina. No entanto, imunologicamente não apresentam reação cruzada entre elas e são codificadas por genes diferentes.

Em pH ácido, as proteínas R se ligam à cobalamina mais fortemente que o IF. Ao contrário do IF, elas são normalmente degradadas pelas proteinases pancreáticas. Dessa forma, na doença pancreática em que as proteínas R não são degradadas, há menos cobalamina disponível para se ligar ao IF, com perda da capacidade de absorção dessa vitamina.

- Nos estágios finais do processo absortivo, a molécula de IF se liga ao receptor ileal na presença de Ca^{2+} e em pH neutro. À medida que o complexo IF-B_{12} atravessa a mucosa do íleo, o IF é liberado e a B_{12} é transferida para a TCII, uma proteína plasmática de transporte. Outras proteínas de ligação de cobalamina, TCI e possivelmente TCIII, existem no plasma e no fígado. No fígado, essas proteínas fornecem formas de armazenamento da vitamina, uma situação que é única para as vitaminas hidrossolúveis.
- A cobalamina ligada à TCII é captada pelos tecidos. A principal forma circulante é a

metilcobalamina. No fígado, a forma principal é a 5'-desoxiadenosil cobalamina, que representa 70%, enquanto a metilcobalamina constitui 3% da quantidade total. O complexo TCII-cobalamina fornece cobalamina aos tecidos, nos quais se liga a receptores de superfície celular específicos. Ele entra na célula por endocitose, liberando por fim a cobalamina na forma de hidroxicobalamina. A conversão de hidroxicobalamina em metilcobalamina ocorre no citosol. A TCII é também considerada necessária para o fornecimento de vitamina B_{12} ao sistema nervoso central.

A função da vitamina B_{12} precisa ser considerada em conjunto com a do folato

As funções da vitamina B_{12} e do folato estão inter-relacionadas, e a deficiência de qualquer um dos dois produz os mesmos sinais e sintomas. A reação que envolve ambas as vitaminas é a conversão da homocisteína em metionina (Fig. 11.7).

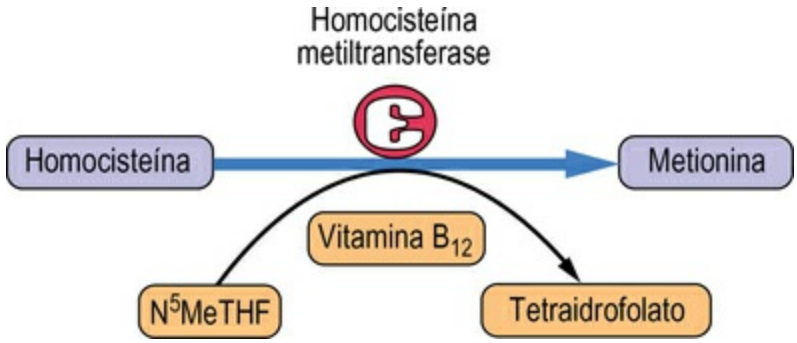


FIG. 11.7 A "armadilha do tetraidrofolato".
A vitamina B_{12} e o folato estão envolvidos na conversão da homocisteína em metionina. A ausência de vitamina B_{12} inibe a reação e leva ao acúmulo de N^5-metiltetraidrofolato (N^5MeTHF).

A **anemia megaloblástica** característica da deficiência de vitamina B_{12} é provavelmente causada por uma deficiência secundária de folato reduzido, e uma consequência do acúmulo de N^5-metiltetraidrofolato. Um quadro neurológico pode também se desenvolver na ausência de anemia. Isso é conhecido como **degeneração combinada subaguda da medula espinal** e é provavelmente secundária a uma deficiência relativa de metionina na medula espinal.

A deficiência da vitamina B_{12} ocasiona o acúmulo de ácido metilmalônico e de homocisteína, com consequente acidúria metilmalônica e homocistinúria.

Ácido fólico

Os derivados do ácido fólico são importantes nas reações de transferência de um único átomo de carbono. São necessários para a síntese de DNA

O ácido fólico (ácido pteroil-l-glutâmico) possui um número de derivados conhecidos coletivamente como folatos. Ele participa em reações de transferência de um único átomo

de carbono, como a metilação (importante tanto no metabolismo quanto na regulação da expressão gênica) e nas vias sintéticas da colina, serina, glicina e metionina. O ácido fólico é também necessário para a síntese de purinas e da pirimidina timina e, dessa forma, à síntese de ácidos nucleicos. Polimorfismos associados a variantes no gene da 5,10-metilenotetraidrofolato redutase, a enzima-chave no metabolismo dos folatos, estão associados a condições tais como o câncer do cólon, espinha bífida e leucemia linfocítica aguda em adultos.

O ácido fólico é fisiologicamente inativo até ser reduzido a ácido di-hidrofólico. Suas formas principais são tetraidrofolato, 5-metil-tetraidrofolato (N^5MeTHF) e N^{10}-formiltetraidrofolato-poliglutamato derivado do N^5MeTHF, encontrado predominantemente nos alimentos frescos. Antes de os poliglutamatos poderem ser absorvidos, eles devem ser hidrolisados pela glutamil hidrolase no intestino delgado. A principal forma circulante de folato é o monoglutamato-N^5-THF.

O ácido fólico é encontrado no fígado, levedura e em vegetais folhosos verdes (espinafre) e frutas, incluindo citrinos. Suas fontes são também cereais e grãos enriquecidos em ácido fólico.

Ele pode ser quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência (HLPC, do inglês *high performance liquid chromatography*).

Análogos estruturais do folato são usados como antibióticos e fármacos antitumorais

Previsivelmente, as células em rápido processo de divisão têm maior necessidade de folato, uma vez que ele é necessário à síntese de purinas e da pirimidina timina, todas necessárias à síntese de DNA (Cap. 31). Os análogos estruturais do folato exibem toxicidade seletiva contra células em crescimento rápido, como as bactérias e as células tumorais. Este é o princípio por detrás do desenvolvimento de fármacos conhecidos como **antagonistas do ácido fólico,** que são utilizados como antibióticos (p. ex., trimetoprima) e agentes antitumorais (metotrexato).

A deficiência de folato é uma das deficiências vitamínicas mais comuns

As causas da deficiência de folato incluem ingestão inadequada, absorção comprometida, metabolismo alterado e necessidade aumentada.

Os exemplos mais comuns de necessidade aumentada ocorrem na gravidez e lactação. A necessidade de ácido fólico aumenta bastante à medida que o volume de sangue e o número de eritrócitos aumentam durante a **gravidez.** No terceiro trimestre de gravidez, a necessidade de ácido fólico duplica. A anemia megaloblástica é rara durante a gravidez (mas não em gravidez múltipla). Contudo, a deficiência de folato aumenta o risco de **defeitos do tubo neural, baixo peso ao nascimento** e **parto prematuro.** Em crianças, resulta em uma reduzida taxa de crescimento. Outras causas de deficiência de folato são o alcoolismo, a má absorção, a diálise e a doença hepática. As deficiências de folato são observadas em idosos, como resultado de dieta pobre e má absorção.

A deficiência de folato em adultos causa anemia megaloblástica

A falha na síntese de metionina e ácidos nucleicos nos estados de deficiência de folato é responsável pelos sinais e sintomas da anemia megaloblástica, isto é, a presença de blastócitos aumentados na medula óssea. Os eritócitos macrocíticos têm membranas frágeis e tendência a hemolisarem: existe anemia macrocítica em associação a uma medula óssea megaloblástica. As alterações hematológicas não podem ser distinguidas da deficiência de vitamina B_{12} (ver a seguir). As alterações neurológicas também são similares. A deficiência de folato também contribui para a hiper-homocisteinemia. Muitos sintomas, como a perda de apetite, diarreia e fraqueza, são inespecíficos.

A ingestão adequada de folato no período da concepção é essencial

O fornecimento de suplementos de folato é prática comum durante a gravidez. A suplementação de folato durante o período periconcepcional (as definições deste período variam: a usada em estudos clínicos é de 4 semanas antes e 8 semanas após a concepção) previne a espinha bífida, uma vez que o fechamento do tubo neural ocorre entre 22 e 28 dias após a concepção.

A vitamina B_{12} deve ser suplementada ao longo do tratamento com folato

A suplementação de folato na ausência de suplementos de vitamina B_{12} pode mascarar os sintomas, mas levar a dano neurológico.

O fornecimento isolado de folato em caso de uma deficiência de vitamina B_{12} agrava a neuropatia. Desse modo, se a suplementação for necessária durante a investigação da causa da anemia megaloblástica, após coleta de amostras de sangue e de medula óssea para confirmar o diagnóstico, o folato deve ser fornecido juntamente com a vitamina B_{12}.

Ácido pantotênico

O ácido pantotênico constitui parte da molécula de coenzima A (CoA)

Encontra-se amplamente distribuído em animais e plantas. Não há evidência de deficiência no homem, exceto em dietas experimentais.

Vitamina C

A vitamina C atua como agente redutor. Sua forma ativa é o ácido ascórbico, que é oxidado durante a transferência de equivalentes redutores, produzindo ácido desidroascórbico. A via sintética e a estrutura da vitamina C são apresentadas na Figura 11.8 e sua atividade antioxidante é ilustrada na Figura 37.8. Participa da regeneração de outra vitamina antioxidante — o α-tocoferol. A vitamina C participa da síntese de colágeno e adrenalina, da esteroidogênese, da degradação da tirosina, da formação de ácidos biliares, assim como da síntese de L-carnitina e de neurotransmissores. Melhora a absorção de ferro não heme e participa do metabolismo mineral ósseo. Sua principal função é manter cofatores metálicos em seus menores estados de valência, como, por exemplo, Fe^{2+} e Cu^{2+}. Na síntese de colágeno, é requisitada

especificamente para a hidroxilação da prolina (Cap. 27).



FIG. 11.8 Estrutura e síntese da vitamina C (ácido ascórbico).
Observe que a enzima que converte a gulonolactona em ácido ascórbico está ausente no homem e em primatas superiores.

A vitamina C é absorvida no intestino por transporte mediado por um carreador e dependente de sódio. É reabsorvida nos túbulos proximais renais. Progressivamente, mais vitamina C é excretada na urina à medida que sua ingestão aumenta.

Os seres humanos não conseguem sintetizar ácido ascórbico, pelo que este é um nutriente essencial

A vitamina C é lábil: é facilmente destruída por oxigênio, íons metálicos, pH aumentado, calor e luz. Os citrinos, frutos de bagas, tomates e pimentões são fontes ricas em vitamina C.

A deficiência de vitamina C causa escorbuto e compromete a função imune

A deficiência de vitamina C causa síntese defeituosa de colágeno. O **escorbuto** é caracterizado por fragilidade capilar, causando hemorragias subcutâneas e outras, fraqueza muscular, gengivas moles, inchadas e sangrentas, queda de dentes, dificuldade na cicatrização de ferimentos e anemia. Ocorre fadiga, mal-estar e depressão. A incapacidade de manter a matriz óssea, em associação à desmineralização, resulta em osteoporose.

A deficiência de vitamina C resultante no quadro clínico completo do escorbuto é atualmente rara, com exceção dos idosos. Formas mais brandas de deficiência de vitamina C são mais comuns, e suas manifestações incluem o aparecimento de hematomas e petéquias (pequenas hemorragias pontuais debaixo da pele). A função imune também fica comprometida. Essa redução na imunocompetência tem sido a base do fornecimento de megadosagens de vitamina C para a prevenção do resfriado comum e também pelo seu papel na prevenção do câncer. No entanto, não existem evidências claras para fundamentar essas propostas, inicialmente feitas por Linus Pauling durante a década de 1970. A vitamina C é certamente necessária para a função leucocitária normal, e os níveis de vitamina C dos leucócitos caem abruptamente durante o estresse causado por trauma ou infecção. Os indivíduos mais idosos se encontram em risco aumentado de deficiência, bem como os fumantes e crianças alimentadas com leite em pó ou fervido.

Não existe evidência de que a vitamina C em excesso seja tóxica. Teoricamente, como ela é metabolizada em oxalato, existe risco de desenvolvimento de cálculos renais de oxalato em indivíduos suscetíveis. No entanto, isso não foi substanciado na prática.

Suplementação vitamínica na dieta

A suplementação de algumas vitaminas resulta em benefícios claros para a saúde. Isso inclui suplementação de ácido fólico para mulheres grávidas ou que estão planejando engravidar, para dessa forma prevenir defeitos do tubo neural; a administração de vitamina D a pessoas que vivem em áreas de pouca luz solar também tem sido benéfica.

Os benefícios da suplementação vitamínica no câncer e na doença cardiovascular são incertos

Como a suplementação de ácido fólico, vitamina B_6 e vitamina B_{12} diminuem a concentração plasmática de homocisteína, foi sugerido que essa prática poderia ser benéfica para a prevenção da doença cardiovascular. Houve também sugestões de que a suplementação de vitaminas A, C e E pudesse ser útil na proteção contra o câncer. Alguns estudos observacionais sugeriram que a suplementação de vitaminas C e E poderia, da mesma forma, ser útil na prevenção de doenças cardiovasculares. No entanto, estudos prospectivos sobre o tema geraram resultados controversos. As recomendações da U.S. Preventive Services Task Force, publicadas em 2003, mencionam que "as evidências atuais são insuficientes para recomendar ou não o uso de suplementos de vitaminas A, C ou E, multivitamínicos com ácido fólico ou combinações antioxidantes na prevenção do câncer ou da doença cardiovascular". Note que estas recomendações não se aplicam às pessoas com carências nutricionais, mulheres grávidas ou lactantes, crianças, idosos e pessoas com doenças crônicas.

A suplementação vitamínica pode ser prejudicial

Como mencionado anteriormente, a suplementação vitamínica em altas doses pode ser prejudicial: os exemplos são a redução da densidade mineral óssea, a hepatotoxicidade e a teratogenicidade associadas a altas doses de vitamina A. A suplementação de β-caroteno em fumantes também foi prejudicial, ocasionando aumento na mortalidade por câncer de pulmão.

As frutas e vegetais são as melhores fontes vitamínicas

Em estudos clínicos, as vitaminas têm sido suplementadas em suas formas puras, e não na forma de fontes alimentares completas, podendo ser esse o motivo pelo qual o benefício da suplementação não foi evidente. Há claramente benefícios em dietas alimentares ricas em vegetais e frutas, os quais são as fontes mais importantes de vitaminas. Não há razão para desencorajar as pessoas de usarem suplementos vitamínicos, com exceção das situações comprovadas de toxicidade.

Os estados de deficiência de vitaminas do complexo B e de folato se encontram resumidos na Figura 11.9. Os pacientes apresentam muitas vezes deficiências múltiplas;

a deficiência de uma única vitamina do complexo B é rara.

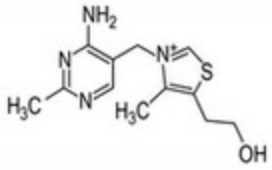
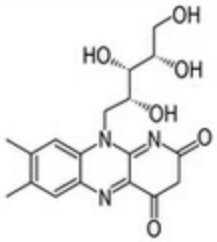
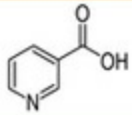
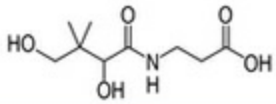
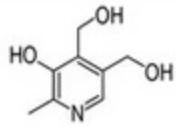
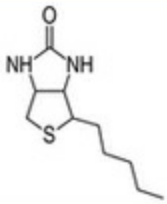
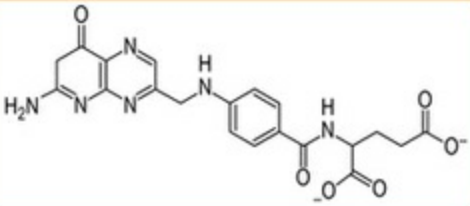
Vitamina	Estrutura	Doença causada pela deficiência	Fonte alimentar
Tiamina (vit. B_1)		Beribéri	Sementes, frutos secos, gérmen de trigo, legumes, carne magra
Riboflavina (vit. B_2)		Pelagra	Carnes, frutos secos, legumes
Niacina (vit. B_3)		Pelagra	Carnes, frutos secos, legumes
Ácido pantotênico (vit. B_5)			Levedura, grãos, gema de ovo, fígado
Piridoxina (vit. B_6)		Doença neurológica	Levedura, fígado, gérmen de trigo, frutos secos, feijões, bananas
Biotina		Dano generalizado	Milho, soja, gema de ovo, fígado, rim, tomates
Folato		Anemia	Levedura, fígado, vegetais verdes
Cobalamina (vit. B_{12})	Complexa	Anemia perniciosa	Fígado, rim, ovo, queijo

FIG. 11.9 Estrutura, fontes e doenças causadas por deficiências das vitaminas do complexo B e do folato.

Minerais

Os principais minerais presentes no organismo humano são o sódio, o potássio, o cloreto, o cálcio, o fosfato e o magnésio

As necessidades diárias do organismo por minerais variam de gramas (sódio, cálcio,

cloreto, fósforo), passando por miligramas (ferro, iodo, magnésio, manganês, molibdênio) até microgramas (zinco, cobre, selênio, outros oligoelementos). Muitos são essenciais à função biológica normal.

O **sódio** e o **cloreto** são importantes para a manutenção da osmolalidade do fluido extracelular e do volume celular (Cap. 24). O sódio participa de fenômenos eletrofisiológicos e, em conjunto com o potássio, é essencial para a manutenção do potencial de membrana e para a transmissão de impulsos (Cap. 8). O **potássio** é o principal cátion extracelular. Encontra-se em vegetais e frutas, em particular nas bananas, e em sucos de fruta. A ingestão diária de potássio tem de ser restringida na doença renal devido à sua excreção comprometida e consequente tendência para hipercalemia (Cap. 24). Deve-se notar que tanto a hipercalemia quanto a hipocalemia podem levar a arritmias potencialmente ameaçadoras.

- O **magnésio** funciona como cofator de muitas enzimas e é também importante na manutenção do potencial elétrico de membrana. Seu papel está ligado ao do potássio e do cálcio. É importante para o desenvolvimento esquelético e para a manutenção do potencial elétrico nas membranas das células nervosas e musculares. É igualmente um cofator para enzimas que requeiram ATP, sendo importante para a replicação de DNA e para a síntese de RNA. A deficiência de magnésio se desenvolve na inanição e na má absorção, pode ser devido à perda a partir do trato gastrintestinal através de diarreia e vômitos e, por vezes, ocorre como resultado de tratamento diurético e de procedimentos cirúrgicos no trato gastrintestinal. Está também associada à pancreatite aguda e ao alcoolismo. A hipomagnesemia é frequentemente acompanhada de hipocalcemia e de hipocalemia. A deficiência de magnésio conduz a fraqueza muscular e a arritmias cardíacas.
- O **cálcio** e o **fosfato** são essenciais para o metabolismo ósseo, para processos secretores e para a sinalização celular (Cap. 26). O cálcio se encontra presente no leite e produtos lácteos, assim como em alguns vegetais. Os fosfatos são abundantes em células vegetais e animais.
- O **iodo** é essencial à síntese dos hormônios tireoidianos (Cap. 39). O teor de iodo dos alimentos depende da composição do solo onde crescerem. Os peixes marinhos e os frutos do mar (moluscos e crustáceos) contêm os níveis mais altos. Está também presente nos peixes de água doce, carne e produtos lácteos, assim como em legumes, frutas e vegetais.
- O **fluoreto** influencia a estrutura dos ossos e do esmalte dentário. Em muitos locais, o fluoreto é adicionado à água para prevenir a cárie dentária. O excesso leva a descoloração dentária e a fragilidade óssea.

Ferro

O ferro é importante para a transferência de oxigênio molecular

O ferro é um componente do grupo heme na hemoglobina e na mioglobina (Cap. 5). Os citocromos *a*, *b* e *c* também contêm ferro (Cap. 9). No seu conjunto, existem 3-4 g de ferro

no organismo. Setenta e cinco por cento do ferro no organismo se encontra na hemoglobina e na mioglobina, e 25% estão armazenados em tecidos, como a medula óssea, o fígado e o sistema reticuloendotelial.

As fontes dietéticas de ferro incluem vísceras, aves, peixe e ostras, assim como gemas de ovo, feijões secos, figos secos e tâmaras secas, bem como alguns vegetais verdes.

O ferro é transportado no plasma ligado à transferrina

O ferro é absorvido no intestino delgado superior. A carne e o ácido ascórbico aumentam sua absorção, enquanto a fibra vegetal a inibe. É transportado no sangue ligado à transferrina e é armazenado na forma de ferritina e hemosiderina. A transferrina se encontra normalmente 30% saturada com ferro. O ferro é perdido através da pele e do trato gastrintestinal.

O ferro da dieta encontra-se na forma férrica (Fe^{3+}). No trato gastrintestinal, é reduzido a Fe^{2+} bivalente pelo ascorbato e por uma enzima ferrirredutase localizada na borda em escova intestinal. O Fe^{2+} é transportado para as células por um transportador de metais bivalentes (que também transporta a maioria dos oligoelementos). O reservatório de ferro no enterócito é controlado pelas proteínas reguladoras do ferro.

O conteúdo em ferro dos eritrócitos afeta sua absorção a partir do intestino

Se os eritrócitos são ricos em ferro, este é armazenado nos enterócitos incorporados na ferritina. De outra forma, ele é transportado através da membrana basolateral, onde uma das proteínas facilitadoras do transporte, a ferroxidase, também denominada hefaestina, oxida o Fe^{2+} a Fe^{3+}, o qual se liga, então, à transferrina no plasma. A transferrina é captada pela medula óssea por células precursoras de eritrócitos, de forma dependente de receptores. Uma vez nas células, o ferro é liberado, novamente reduzido a Fe^{2+} e transportado para a mitocôndria para incorporação no grupo heme na forma Fe^{2+}. Após a destruição dos eritrócitos velhos pelos macrófagos no sistema reticuloendotelial, o ferro é liberado como Fe^{2+}, reoxidado a Fe^{3+}, e novamente carregado na transferrina. O esquema do metabolismo do ferro é apresentado na Figura 11.10.

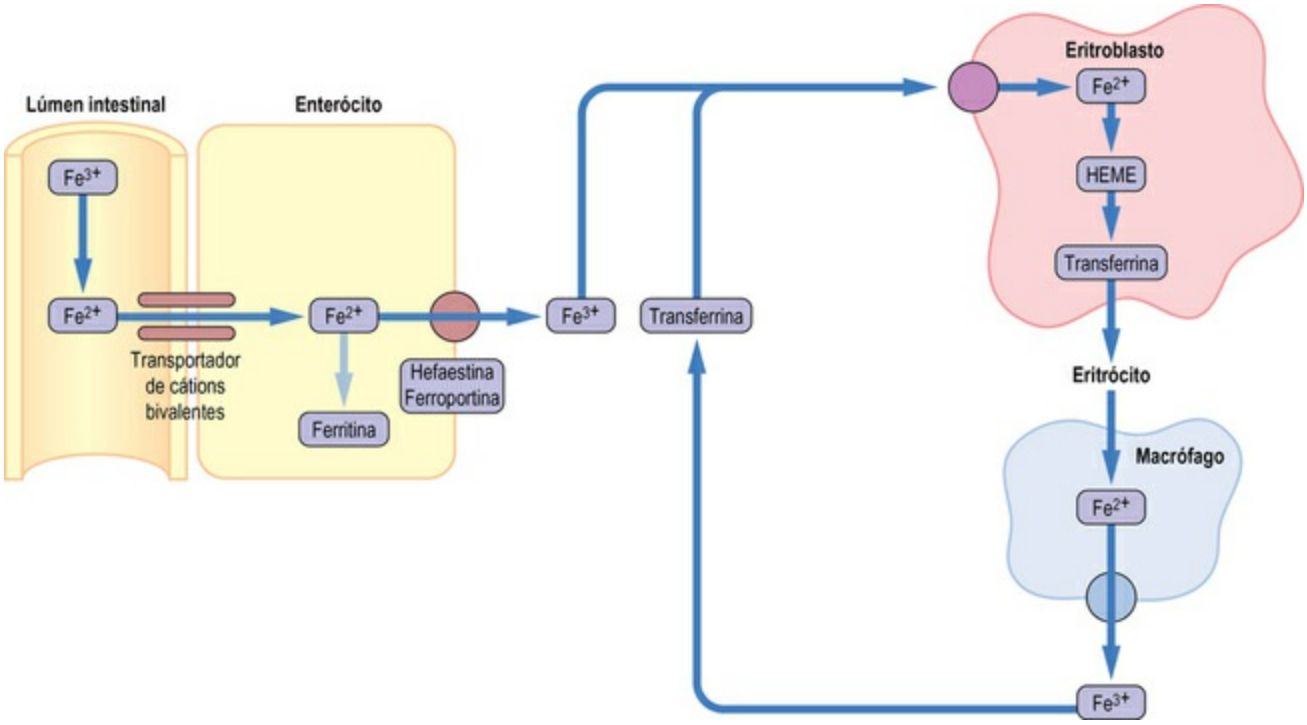


FIG. 11.10 Metabolismo do ferro.
O ferro da dieta é absorvido no intestino e é armazenado nos enterócitos sob a forma de ferritina, ou é transportado para o plasma. A hefaestina e a ferroportina são transportadores de ferro localizados na membrana basolateral do enterócito. No plasma, o ferro permanece ligado à transferrina. É captado por células como os eritroblastos, por intermediação do receptor membranar de transferrina. Nos eritroblastos, o ferro é incorporado no grupo heme e, em seguida, na hemoglobina. Os eritrócitos velhos são degradados por macrófagos no sistema reticuloendotelial. O ferro livre é liberado das células e reciclado em ligação com a transferrina. Note que o ferro da dieta se encontra na forma férrica (Fe^{3+}). Esta é reduzida a íon ferroso (Fe^{2+}) na borda em escova intestinal. A forma transportada do ferro é novamente a férrica, mas a forma incorporada no grupo heme é a ferrosa.

A deficiência de ferro causa anemia

A necessidade de ferro aumenta ao longo do crescimento e da gravidez. A deficiência de ferro resulta em eritropoese defeituosa e em anemia hipocrômica normocítica ou microcítica (eritrócitos pequenos). Isso é mais fácil de ocorrer em crianças e adolescentes, em grávidas e em mulheres menstruando, e também em idosos. A deficiência de ferro muitas vezes é resultado de perda anormal de sangue, e, portanto, é necessário investigar a causa do sangramento em pessoas que apresentem anemia por esse motivo, em particular do trato gastrintestinal.



Quadro clínico

Hemocromatose

A hemocromatose é um distúrbio autossômico recessivo resultante da absorção aumentada de ferro. É o distúrbio hereditário mais comum nas pessoas com ascendência no norte da Europa.

O ferro se acumula no coração, fígado e pâncreas e pode causar cirrose hepática, carcinoma hepatocelular, diabetes, artrite e falha cardíaca. Na forma clássica da

hemocromatose, o gene mutado codifica a proteína conhecida como proteína da hemocromatose hereditária (HFE), a qual é estruturalmente similar aos antígenos de histocompatibilidade principal de classe I (Cap. 38). Sabe-se agora que mutações de outras proteínas podem levar a um quadro clínico muito semelhante.

A avaliação dos níveis de ferro inclui medições da transferrina e da ferritina no plasma, de variáveis hematológicas e esfregaço da medula óssea.

Os seres humanos não possuem um mecanismo de excreção do ferro, e o ferro livre é tóxico.

Oligoelementos

Zinco

O zinco é componente de inúmeras (aproximadamente cem) enzimas associadas ao metabolismo de carboidratos e energético, à síntese e degradação de proteínas e à síntese de ácidos nucleicos

Ele desempenha um papel no transporte celular e na proteção do dano oxidativo, assim como na função imune, divisão celular e crescimento. A espermatogênese também é dependente de zinco. O zinco tem um papel na manutenção das funções exócrina e endócrina do pâncreas. Seus efeitos são observados de forma mais óbvia na manutenção da integridade da pele e na cicatrização.

O zinco da dieta compartilha mecanismos de transporte intestinais com o cobre e o ferro

Na absorção, o zinco está ligado a metalotioneínas, uma família de proteínas ricas em cisteína, que também se ligam a outros íons metálicos bivalentes, como o cobre. A síntese de metalotioneínas é dependente da quantidade de oligoelementos presentes na dieta. A síntese aumentada constitui parte da resposta metabólica ao trauma e resulta em uma redução da concentração sérica de zinco.

A deficiência de zinco é comum

Perdas aumentadas de zinco ocorrem em pacientes com queimaduras extensas e naqueles com lesão renal. A perda de zinco na doença renal se deve à sua associação com a albumina plasmática, e acompanha a perda urinária de proteína. Quantidades substanciais de zinco também podem ser perdidas durante a diálise. Durante a alimentação intravenosa, a falha de reposição do mesmo pode produzir deficiência sintomática.

As fontes de zinco incluem **ostras** (conteúdo mais elevado), **carne vermelha, aves, feijões** e **nozes.** Note que os fitatos se ligam ao zinco. O zinco não é armazenado no organismo.

A deficiência de zinco pode resultar da má absorção associada a cirurgia

gastrintestinal, síndrome do intestino curto, doença de Crohn e colite ulcerosa, e pode ocorrer nas doenças hepática e renal. Doenças crônicas como o diabetes, condições malignas e diarreia crônica também levam a deficiência. As grávidas e os alcoólatras são mais suscetíveis à deficiência.

A deficiência de zinco afeta o crescimento, a integridade da pele e a cicatrização

Em crianças, a deficiência de zinco é caracterizada por retardo de crescimento, lesões na pele e comprometimento da função imune e do desenvolvimento sexual. Um defeito hereditário específico na absorção de zinco pelo intestino foi identificado na década de 1970; ficou conhecido como **acrodermatite êntero-hepática,** evidenciando lesões graves na pele, diarreia e queda de cabelo (alopecia). A deficiência de zinco também ocasiona alterações no paladar e olfato, além de **retardo na cicatrização.**

O zinco é provavelmente o menos tóxico de todos os oligoelementos metálicos, mas sua ingestão elevada interfere na absorção do cobre, podendo levar à sua deficiência e à anemia.

Os suplementos de zinco são usados no tratamento da diarreia em crianças

Foi demonstrado que a suplementação de zinco reduz a gravidade e a duração da diarreia em crianças nos países em desenvolvimento, prevenindo episódios de diarreia subsequentes. Assim, os suplementos de zinco são atualmente recomendados pela OMS/UNICEF, em conjunto com o tratamento de reidratação oral.

A medição da concentração do zinco sérico é o método usual para avaliar os níveis de zinco. No entanto, várias condições e fatores ambientais afetam sua concentração plasmática, incluindo inflamação, estresse, câncer, tabagismo, administração de esteroides e hemólise.

Cobre

O cobre metaboliza o superóxido e outras espécies reativas do oxigênio

O cobre está associado a várias enzimas oxigenases, incluindo a citocromo oxidase e a superóxido dismutase (esta última também necessita de zinco). Um dos principais papéis do cobre, especialmente na superóxido dismutase, mas também em associação com a proteína plasmática carreadora de cobre ceruloplasmina, é a metabolização do superóxido e de outras espécies reativas do oxigênio. O cobre também é necessário para fazer as ligações cruzadas do colágeno, sendo um componente essencial da lisil oxidase.



Quadro clínico

Um homem tratado com nutrição parenteral que desenvolveu erupções generalizadas: deficiência de zinco

Um homem de 34 anos que necessitou de uma alimentação completa intravenosa

vem recebendo a mesma prescrição por aproximadamente 4 meses, sem avaliação de seus níveis de oligoelementos. Durante este período, ele continuou a ter perdas gastrintestinais significativas e pirexia intermitente. Desenvolveu erupções no rosto, cabeça e pescoço, acompanhadas de queda de cabelo. Estava claramente com deficiência de zinco, com uma concentração sérica de zinco inferior a 1 μmol/L (faixa: 9-20 μmol/L; 60-130 μg/dL).

Comentário

Pacientes com doenças catabólicas graves e perdas gastrintestinais aumentadas apresentam um aumento acentuado das demandas de zinco. O estado de depleção de zinco que esse paciente desenvolveu agravaria sua doença ao impedir a recuperação de suas lesões gastrintestinais, tornando-o mais suscetível a infecção, devido a defeitos em sua competência imune. Pacientes que recebem alimentação intravenosa precisam ter seus níveis de micronutrientes monitorados regularmente.

As vias do metabolismo do cobre são compartilhadas com outros metais

A absorção do cobre pelo intestino está, da mesma forma que a do zinco, associada à metalotioneína. A disponibilidade de cobre na dieta é menos afetada pelos constituintes alimentares do que a do zinco, embora uma ingestão elevada de fibra reduza a disponibilidade por formação de complexos com o cobre. No plasma, o cobre absorvido é ligado à albumina. O complexo cobre-albumina é rapidamente captado pelo fígado. Dentro do hepatócito, o cobre se associa a metalotioneínas intracelulares, que também são capazes de se ligar ao zinco e ao cádmio. O cobre é transportado dentro do hepatócito para locais de síntese proteica por uma proteína chaperonina e é incorporado na apoceruloplasmina. Essa incorporação é catalisada por uma ATPase chamada ATP7B. A ceruloplasmina é então liberada na circulação. O único mecanismo de excreção do cobre é sua eliminação através da bile (Fig. 11.11).

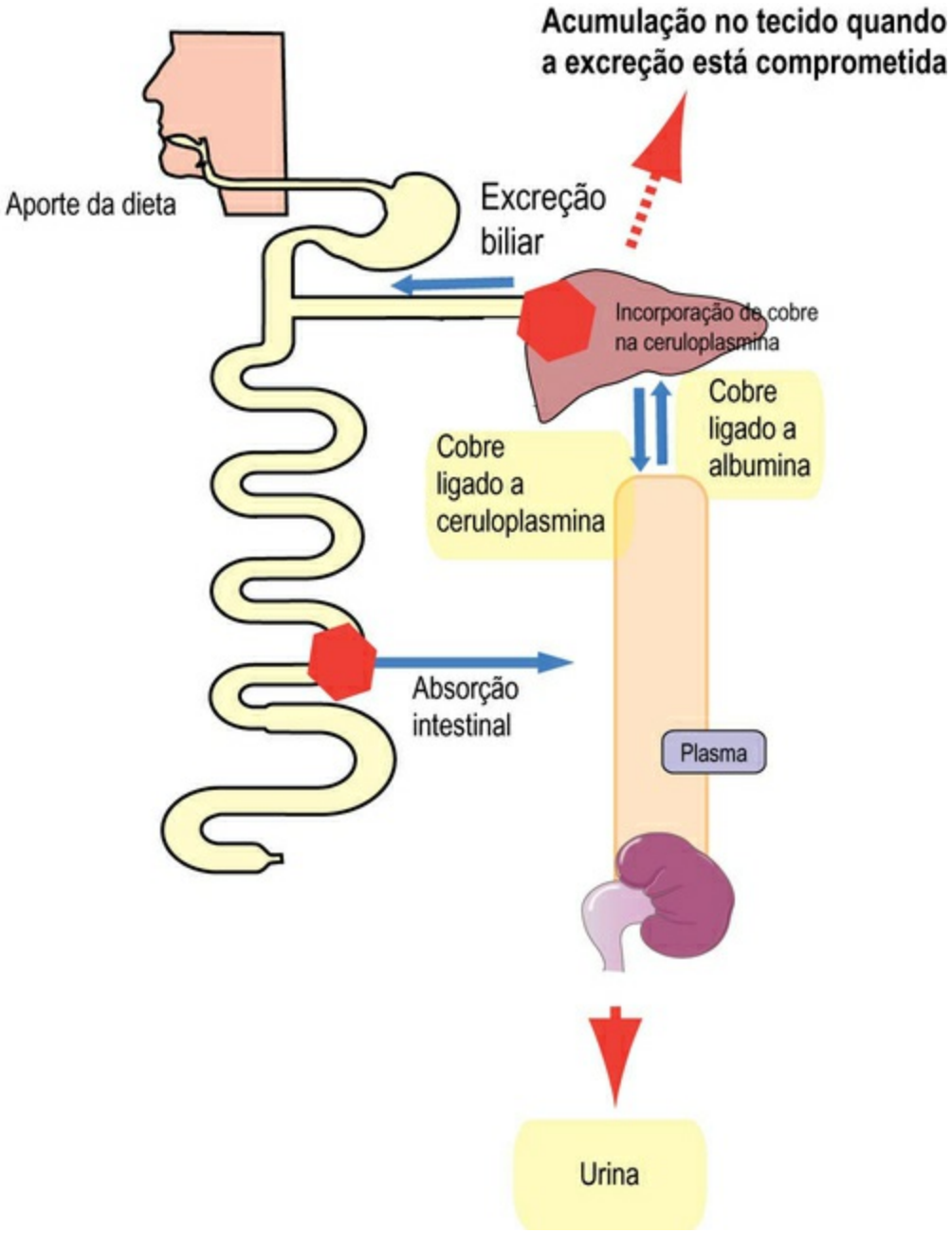


FIG. 11.11 Metabolismo do cobre.
Reproduzido a partir de Dominiczak MH. Medical Biochemistry Flash Cards. London: Elsevier, 2012, Card 42.

A deficiência de cobre é rara e leva a anemia; pele e cabelo podem também ser afetados

A deficiência de cobre é rara e ocorre com maior probabilidade na sequência da ingestão reduzida ou da perda excessiva, como, por exemplo, durante a diálise renal. A deficiência se manifesta como **anemia microcítica hipocrômica** (caracterizada por eritrócitos pálidos) resistente à terapia com ferro. Há também uma redução no número de leucócitos sanguíneos (neutropenia) e degeneração do tecido vascular com sangramento, devido aos problemas na síntese de elastina e colágeno. Na deficiência grave, também podem ocorrer despigmentação da pele e alteração da estrutura do cabelo. A muito rara *síndrome de Menkes* resulta da depleção de cobre, causada por deficiência na ATPase intestinal ATP7A.

O excesso de cobre causa cirrose hepática

Quando ingerido oralmente, o cobre normalmente não é tóxico. Porém, em altas doses ele se acumula nos tecidos. A ingestão excessiva crônica ocasiona cirrose hepática. A toxicidade aguda se manifesta por acentuada hemólise e danos no fígado e nas células cerebrais. A última é observada em um distúrbio metabólico genético autossômico recessivo, a **doença de Wilson,** no qual a capacidade hepática de síntese da ceruloplasmina está comprometida. A causa está nas mutações do gene que codifica a ATPase ATP7B. Isso ocasiona uma redução na incorporação do cobre na ceruloplasmina e em seu acúmulo celular. O excesso de apoceruloplasmina é degradado. O cobre se acumula em tecidos como o cérebro e a córnea. Os pacientes apresentam sintomas neurológicos ou cirrose hepática e têm **anéis de Kayser-Fleischer** típicos na córnea. Há também uma baixa concentração de ceruloplasmina e elevada excreção urinária de cobre (Quadro na página 88).

Selênio

O selênio está presente em todas as células na forma dos aminoácidos selenometionina e selenocisteína

O selênio é um componente das selenoproteínas, que contêm o aminoácido selenocisteína. A enzima antioxidante glutationa peroxidase é uma selenoproteína, bem como as iodotironina deiodinases, enzimas que produzem a tri-iodotironina (T_3) e a T_3 reversa (rT_3). As tioredoxina redutases que participam na proliferação celular, apoptose e síntese de DNA também contêm selenocisteína.

O selênio afeta funções do sistema imune, incluindo estimulação da diferenciação das células T e proliferação de linfócitos T ativados, assim como o aumento da atividade das células *natural killer*. Também desempenha um papel na espermatogênese.

O selênio é absorvido no intestino delgado. Permanece ligado a proteínas na circulação e é excretado na urina. A selenoproteína P possui 10 resíduos de selenocisteína e transporta selênio no plasma desde o fígado para o cérebro, testículos e rim, primariamente. No cérebro, liga-se ao receptor de membrana apoER2, que pertence à família dos receptores de lipoproteínas.

O selênio está presente na dieta como selenometionina e selenocisteína. As castanhas do Brasil são sua fonte mais rica. Suas fontes dietéticas também incluem vísceras de animais, peixe (atum), frutos do mar e cereais. Sua concentração em alimentos vegetais depende do conteúdo do solo.

Os níveis de selênio podem influenciar o risco de muitas condições crônicas

Baixos níveis de selênio estão associados a um declínio na função imune e a problemas cognitivos. Concentrações reduzidas são observadas em indivíduos com crises epiléticas e também na pré-eclâmpsia. A deficiência de selênio pode igualmente se desenvolver durante a **nutrição parenteral total.** Existe uma cardiomiopatia rara **(doença de Keshan)** que responde ao selênio e que é endêmica na China, em áreas de ingestão muito baixa de

selênio. A deficiência de selênio pode também ocasionar dor muscular crônica, leitos subungueais anormais e cardiomiopatia. O excesso de selênio, por outro lado, leva a cirrose hepática, esplenomegalia, sangramento gastrintestinal e depressão.

Pode ser necessário um aumento da ingestão de selênio durante a lactação. Vários estudos indicam o papel benéfico do selênio no risco de câncer do pulmão, próstata e bexiga, entre outros. Demonstrou-se que polimorfismos de nucleotídios únicos em genes de selenoproteínas são importantes para a determinação do risco de condições como vários cânceres, pré-eclâmpsia e, possivelmente, doença cardiovascular.

Atualmente, acredita-se que, enquanto os indivíduos com baixa concentração de selênio podem obter benefícios da suplementação, esta pode ser prejudicial em indivíduos com valores normais ou elevados.

Outros metais

Vários outros oligoelementos são necessários a uma função biológica normal: por exemplo, o manganês, o molibdênio, o vanádio, o níquel e o cádmio. Alguns, de forma semelhante ao zinco e ao cobre, constituem grupos prostéticos de enzimas. Esses incluem o **molibdênio** (xantina oxidase) e o **manganês** (superóxido dismutase e piruvato carboxilase). O **crômio** tem sido associado à tolerância à glicose.

Muitos destes metais eram anteriormente considerados tóxicos; de fato, seu excesso ambiental resulta em toxicidade, como a toxicidade renal observada em trabalhadores portuários expostos ao **cádmio** por longos períodos de tempo. À medida que as técnicas de separação e análise se desenvolvem, outros metais e outras funções de minerais essenciais conhecidos serão descobertos. Isso levará a uma melhor compreensão da epidemiologia de certas doenças, as quais podem ter, pelo menos em parte, uma etiologia ambiental.

Resumo

- As vitaminas funcionam principalmente como cofatores enzimáticos.
- As vitaminas lipossolúveis podem ser armazenadas no tecido adiposo, mas as hidrossolúveis possuem apenas uma reserva a curto prazo.
- As deficiências de micronutrientes da dieta ocorrem com maior frequência em grupos suscetíveis com demanda aumentada, ou em pessoas incapazes de manter ingestão adequada. Crianças, grávidas, idosos, alcoólatras e grupos com baixos rendimentos são particularmente vulneráveis.
- A doença gastrintestinal e a cirurgia gastrintestinal são causas potenciais de deficiências de micronutrientes.
- Os suplementos de vitaminas e de oligoelementos são particularmente importantes em pacientes submetidos a dietas artificiais e a nutrição parenteral.
- Enquanto existirem controvérsias sobre a suplementação de algumas vitaminas, a ingestão de frutas e vegetais como fontes de micronutrientes é inequivocamente recomendada.

Questões para aprendizagem

1. Compare e contraste as deficiências de vitamina B_{12} e ácido fólico.
2. Quando pode o aumento da ingestão de determinado nutriente ou energia precipitar deficiências vitamínicas?
3. A suplementação de vitamina A é segura?
4. Descreva a importância clínica do cobre.
5. Quais vitaminas têm um papel no desenvolvimento de hiperomocisteinemia?

Leituras sugeridas

Asplund, K. Antioxidant vitamins in the prevention of cardiovascular disease: a systematic review. *J Int Med*. 2002; 251:372–392.

El-Youssef, M. Wilson disease. *Mayo Clin Proc*. 2003; 78:1126–1136.

Fairfield, K. M., Fletcher, R. H. Vitamins for chronic disease prevention in adults: scientific review. *JAMA*. 2002; 287:3116–3126.

Fletcher, R. H., Fairfield, K. M. Vitamins for chronic disease prevention in adults: clinical applications. *JAMA*. 2002; 287:3127–3129.

Fisher Walker, C. L., Black, R. E. Zinc treatment for serious infections in young infants. *Lancet*. 2012; 379:2031–2033.

Lucock, M. Is folic acid the ultimate functional food component for disease prevention? *BMJ*. 2004; 328:211–214.

Panel on Dietary Reference Values of the Committee on Medical Aspects of Food Policy: *Dietary reference values for food energy and nutrients for the United Kingdom*, London, 2003, TSO.

Rayman, M. Selenium and human health. *Lancet*. 2012; 379:1256–1268.

Schneider, B. D., Leibold, E. A. Regulation of mammalian iron homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2000; 3:267–273.

Sites

Bender, D. A. *Introduction to nutrition and metabolism*, 4th ed. Boca Raton, FL: CRC Press; 2008.

FAO Corporate Document Repository: Human vitamin and mineral requirements, http://www.fao.org/docrep/004/Y2809E/y2809e01.htm#TopOfPage.

Fact sheets concerning vitamins and trace elements are available from the Office of Dietary Supplements, National Institutes of Health, USA, http://ods.od.nih.gov/factsheets/list-all/.

UNICEF: Nutrition in emergencies, www.unicef.org/nutrition/training/2.1/5.html.

CAPÍTULO 12

Metabolismo Anaeróbico da Glicose nos Eritrócitos

John W. Baynes

Objetivos

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever a sequência de reações da glicólise anaeróbica, a via central do metabolismo de carboidratos em todas as células.
- Resumir a energética da glicólise anaeróbica, incluindo as reações envolvidas na utilização e na formação do ATP e o rendimento líquido de ATP durante a glicólise.
- Identificar o sítio primário da regulação alostérica da glicólise e o mecanismo de regulação desta enzima.
- Identificar os passos na glicólise que demonstram o uso de reações acopladas para permitir processos termodinamicamente desfavoráveis, incluindo a fosforilação em nível de substrato.
- Descrever os principais papéis da via das pentoses fosfato nos eritrócitos e nas células nucleadas.
- Descrever o papel da glicólise anaeróbica no desenvolvimento de cáries dentárias.
- Explicar por que a glicólise é essencial para as funções normais das hemácias, incluindo as consequências das deficiências em enzimas glicolíticas e o papel da glicólise na adaptação a grandes altitudes.
- Explicar a origem da anemia hemolítica induzida por fármacos em pessoas com deficiência de G6PD.

Introdução

A glicólise é a via central do metabolismo da glicose em todas as células

A glicose é o principal carboidrato na Terra, o esqueleto e a unidade monomérica da celulose e do amido. É também o único combustível utilizado por todas as células do nosso corpo. Todas essas células, até mesmo os micróbios que estão no nosso intestino, iniciam o metabolismo da glicose por uma via denominada glicólise, ou seja, quebra (lise) de carboidrato (glico). A glicólise é catalisada por enzimas citosólicas solúveis e é a via metabólica central e ubíqua do metabolismo da glicose. O eritrócito, comumente conhecido como célula vermelha sanguínea (CVS), ou hemácia, é singular entre todas as células do corpo — ele utiliza a glicose e a glicólise como sua única fonte de energia. Assim, o eritrócito é um modelo útil para uma introdução à glicólise.

O piruvato, um ácido carboxílico de três carbonos, é o produto final da glicólise; dois moles de piruvato são formados por mol de glicose

Em células que têm mitocôndria e metabolismo oxidativo, o piruvato é convertido completamente em CO_2 e H_2O — a glicólise nesse caso é denominada **glicólise aeróbica.** Nos eritrócitos, que não possuem mitocôndria e não realizam o metabolismo oxidativo, o piruvato é reduzido a ácido lático, um hidroxiácido de três carbonos, o produto da **glicólise anaeróbica.** Cada mol de glicose rende dois moles de lactato, os quais são excretados para o sangue. Duas moléculas de ácido lático contêm exatamente o mesmo número de carbonos, hidrogênios e oxigênios que uma molécula de glicose (Fig. 12.1); entretanto, há energia livre disponível a partir da clivagem e rearranjo da molécula de glicose suficiente para produzir dois moles de ATP por mol de glicose convertida a lactato. O eritrócito utiliza a maior parte do seu ATP para manter os gradientes eletroquímicos e iônicos através da sua membrana plasmática.

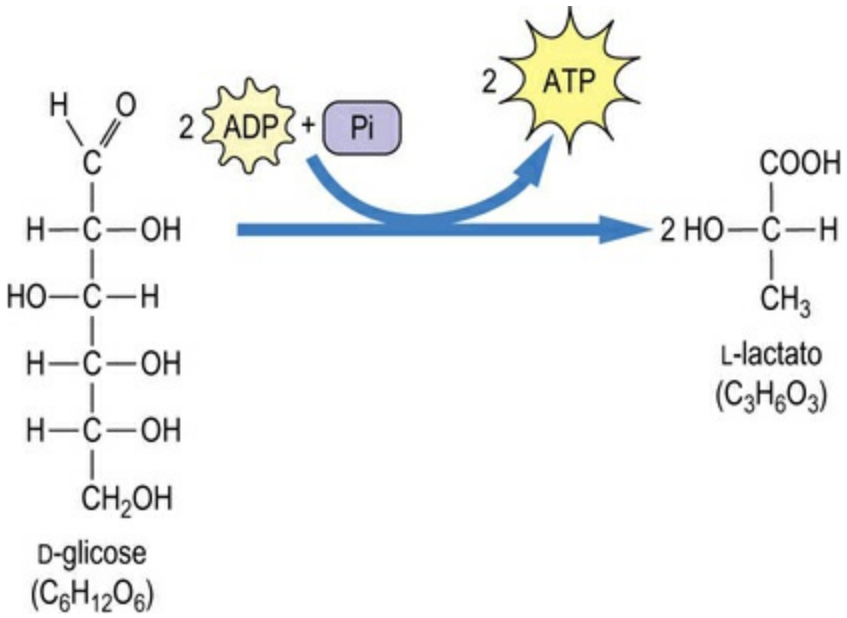


FIG. 12.1 Conversão da glicose a lactato durante a glicólise anaeróbica. Um mol de glicose é convertido a dois moles de lactato durante a glicólise anaeróbica. Não há consumo de oxigênio nem há produção de CO_2 nessa via. Há um saldo de dois moles de ATP por mol de glicose convertido a lactato.

Na CVS, 10-20% do intermediário glicolítico 1,3-bisfosfoglicerato são desviados para a

síntese de 2,3-bisfosfoglicerato (2,3-BPG), um regulador alostérico da afinidade da hemoglobina pelo O_2 (Cap. 5). A **via das pentoses fosfato,** que leva a um desvio da glicólise, representa cerca de 10% do metabolismo da glicose no eritrócito. No eritrócito, essa via tem um papel especial na proteção contra o estresse oxidativo, enquanto em células nucleadas ela também serve como fonte de NADPH para reações biossintéticas e de pentoses para a síntese de ácidos nucleicos.

O eritrócito

O eritrócito ou hemácia depende exclusivamente da glicose sanguínea como combustível metabólico

O eritrócito, ou hemácia, representa 40-45% do volume sanguíneo e mais de 90% dos elementos figurados do sangue (eritrócitos, leucócitos e plaquetas). O eritrócito é, tanto estrutural quanto metabolicamente, a célula mais simples do corpo — o produto final da maturação dos reticulócitos da medula óssea. Durante sua maturação, a CVS perde todas as suas organelas subcelulares. A ausência do núcleo impossibilita a síntese de DNA e RNA. Sem ribossomos e retículo endoplasmático, ela não pode sintetizar ou secretar proteínas. Por não poder oxidar gorduras, um processo que requer atividade mitocondrial, o eritrócito conta exclusivamente com a glicose sanguínea como combustível. O metabolismo da glicose nos eritrócitos é inteiramente anaeróbico, sendo compatível com o papel primário dos eritrócitos no transporte e liberação de oxigênio, preferencialmente à sua utilização.

Quadro de conceitos avançados

Utilização da glicose nas hemácias

Em uma pessoa de 70 kg, existem cerca de 5 L de sangue e pouco mais de 2 kg (2 L) de hemácias. Essas células constituem cerca de 3% do total da massa corporal e consomem cerca de 20 g (0,1 mol) de glicose por dia, representando aproximadamente 10% do metabolismo total de glicose no corpo. As hemácias possuem a maior taxa específica de utilização de glicose do que qualquer célula do corpo, aproximadamente 10 g de glicose/kg de tecido/dia, comparado com aproximadamente 2,5 g de glicose/kg de tecido/dia para o corpo inteiro.

Na CVS, cerca de 90% da glicose são metabolizados através da glicólise, gerando lactato, o qual é excretado para o sangue. Apesar da sua alta taxa de consumo de glicose, a CVS tem uma taxa de síntese de ATP mais baixa do que qualquer outra célula do corpo, aproximadamente 0,1 mol de ATP/kg de tecido/dia, refletindo o fato de que a glicólise anaeróbica restaura somente uma fração da energia disponível da combustão completa da glicose a CO_2 e H_2O.

Glicólise

Visão geral

O piruvato é o produto final da glicólise anaeróbica

A glicose entra no eritrócito por difusão facilitada, através do transportador de glicose independente de insulina, o GLUT-1. Depois a glicólise progride através de uma série de intermediários fosforilados, iniciando pela síntese de glicose-6-fosfato (Glc-6-P). Durante esse processo, o qual envolve dez etapas catalisadas por enzimas, duas moléculas de ATP são gastas (estágio de **investimento**) para produzir um intermediário aproximadamente simétrico, a frutose-1,6-bisfosfato (Fru-1,6-BP), a qual é depois clivada (estágio de **divisão**) a duas trioses fosfato de três carbonos. Estes são eventualmente convertidos a lactato, com produção de ATP, durante o estágio de **rendimento** da glicólise. O estágio de rendimento inclui tanto reações redox quanto de fosforilação, levando à formação de quatro moléculas de ATP durante a conversão de duas trioses fosfato a lactato. A consequência é um saldo de dois moles de ATP por mol de glicose convertido a lactato.

A glicólise é uma via relativamente ineficiente para extrair energia a partir de glicose: o saldo de dois moles de ATP por mol de glicose é de apenas cerca de 5% dos 30-32 ATPs disponíveis após a completa oxidação de glicose a CO_2 e H_2O pela mitocôndria em outros tecidos (Cap. 14).

Você deve estar se perguntando por que uma via de 10 passos é necessária para converter glicose a lactato; isso não poderia ser feito com menos etapas ou pela clivagem de um carbono por vez? A resposta, sob um ponto de vista metabólico, é que a glicólise não é uma via isolada; a maioria dos intermediários glicolíticos serve como pontos de ramificação para outras vias metabólicas. Desse modo, o metabolismo da glicose intercepta o metabolismo das gorduras, proteínas e ácidos nucleicos, assim como outras vias de metabolismo de carboidratos. Algumas dessas interações metabólicas estão ilustradas na Figura 12.2.

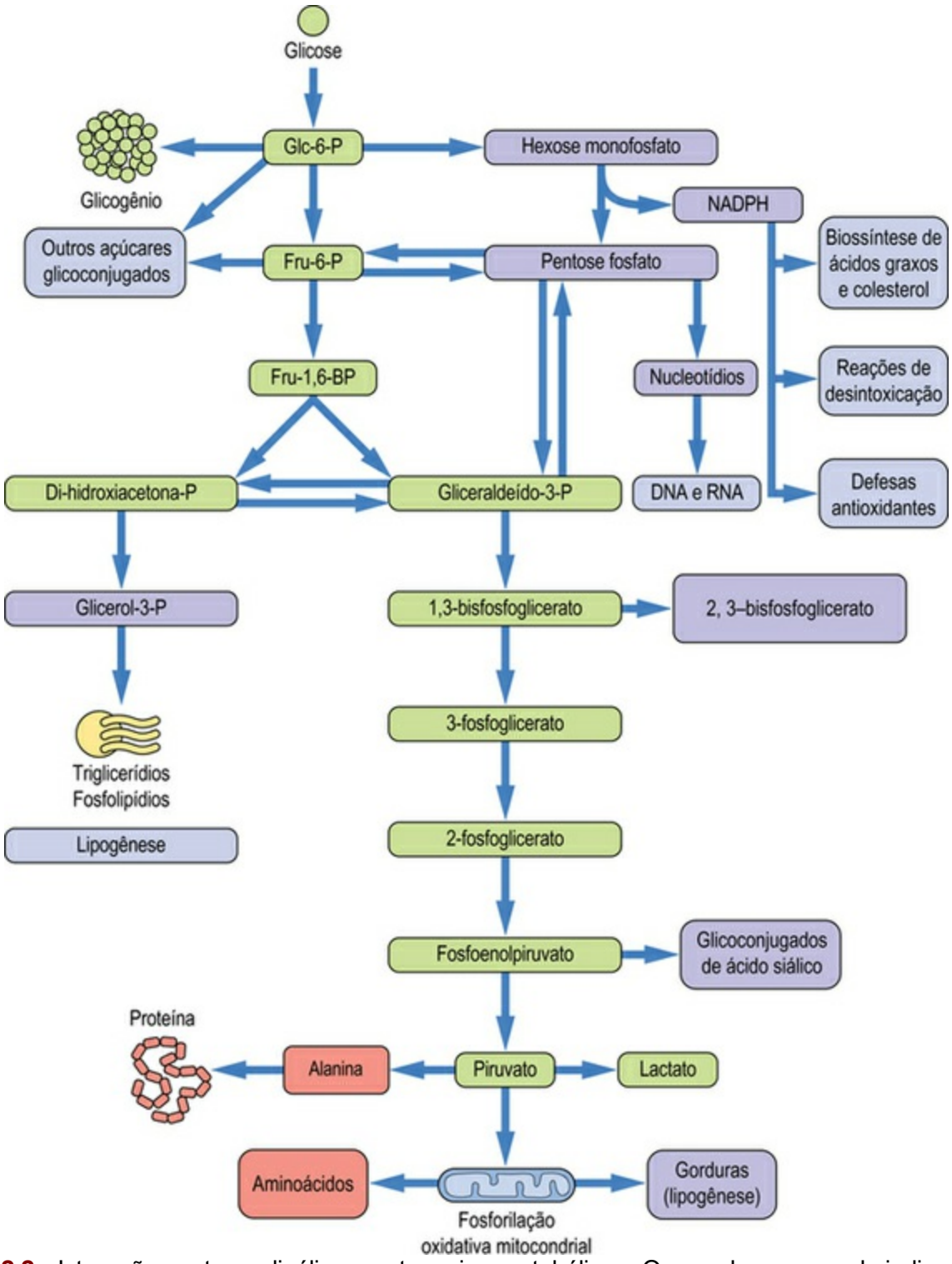


FIG. 12.2 Interações entre a glicólise e outras vias metabólicas. Os quadros em verde indicam os intermediários envolvidos na via da glicólise. Os outros quadros ilustram algumas das interações metabólicas entre a glicólise e outras vias metabólicas na célula. Nem todas essas vias são ativas na hemácia, a qual tem capacidade biossintética limitada e ausência de mitocôndria. Glc-6-P, glicose-6-fosfato; Fru-6-P, frutose-6-fosfato; Fru-1,6-BP, frutose-1,6-bisfosfato.

O estágio de investimento da glicólise

São investidos 2 ATP para iniciar o metabolismo da glicose através da glicólise

Glicose-6-fosfato

A glicose é captada pela hemácia por transporte facilitado via GLUT-1 (Cap. 8); essa proteína representa aproximadamente 5% do total de proteínas de membrana da hemácia, de modo que o transporte de glicose não é um fator limitante para a glicólise. Assim, a concentração de estado estacionário da glicose no eritrócito é somente cerca de 20% mais baixa do que no plasma. O primeiro passo no comprometimento da glicose com a glicólise é a fosforilação da glicose a Glc-6-P, catalisada pela enzima hexocinase (Fig. 12.3, topo). A formação de Glc-6-P a partir de glicose livre e fosfato inorgânico é energeticamente desfavorável, então uma molécula de ATP deve ser consumida ou *investida* na reação de fosforilação: a hidrólise do ATP é acoplada à síntese de Glc-6-P. A Glc-6-P fica presa no eritrócito, junto com outros intermediários fosforilados da glicólise, pois não existem sistemas de transportadores para açúcares fosfatados nas membranas plasmáticas das células de mamíferos.

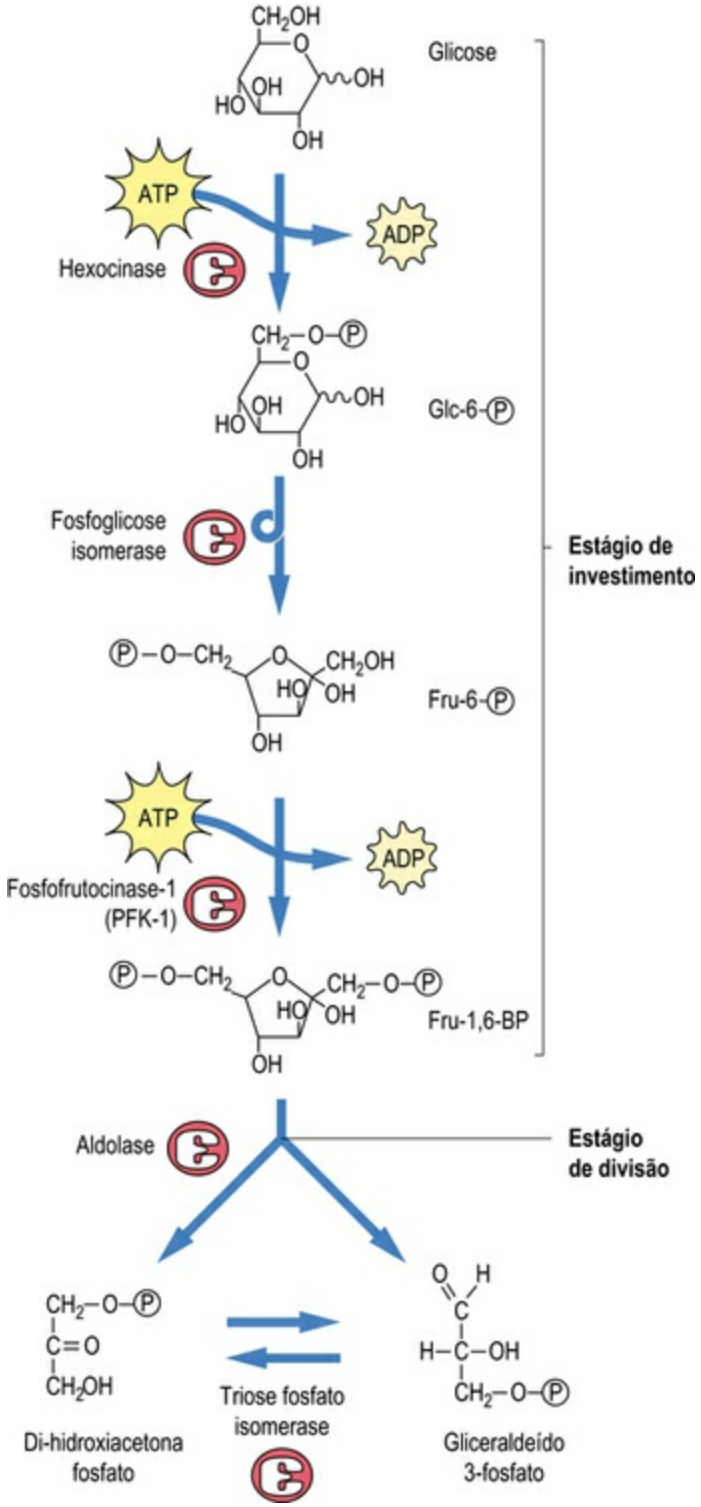


FIG. 12.3 Os estágios de investimento e divisão da glicólise. Observe o consumo de ATP nas reações da hexocinase e fosfofrutocinase-1.

Frutose-6-fosfato

A segunda etapa da glicólise é a conversão de Glc-6-P a Fru-6-P por uma fosfoglicose isomerase (Fig. 12.3, meio). As isomerases catalisam reações de equilíbrio livremente reversíveis, nesse caso uma interconversão aldose-cetose. Uma segunda molécula de ATP é investida para fosforilar a Fru-6-P na posição C-1: a reação é catalisada pela fosfofrutocinase-1 (PFK-1). O produto, a frutose 1,6-bifosfato (Fru-1,6-BP), é um intermediário pseudossimétrico, com um fosfoéster em cada extremidade da molécula. Tal qual a hexocinase, a PFK-1 requer ATP como substrato e catalisa uma reação

essencialmente irreversível (K_{eq} ~500). Tanto a hexocinase quanto a PFK-1 são enzimas regulatórias importantes na glicólise, mas a PFK-1 é a etapa crítica que compromete a via. Essa reação direciona a glicose para a glicólise, a única via para o metabolismo da Fru-1,6-BP.

O estágio de divisão da glicólise

A Frutose-1,6-BP é clivada ao meio por uma reação aldol-reversa (aldolase)

A reação da aldolase (Fig. 12.3, inferior) é uma reação de equilíbrio livremente reversível, gerando duas trioses fosfato, di-hidroxiacetona fosfato e gliceraldeído-3-fosfato, a partir do início e da metade final da molécula de Fru-1,6-BP, respectivamente. Somente o gliceraldeído-3-fosfato continua através do estágio de rendimento da glicólise, mas a triose fosfato isomerase catalisa a interconversão de di-hidroxiacetona fosfato e gliceraldeído-3-fosfato; assim, ambas as metades da molécula de glicose são eventualmente metabolizadas a lactato.

O estágio de rendimento da glicólise — síntese de ATP por fosforilação em nível de substrato

O estágio de rendimento da glicólise produz quatro moles de ATP, rendendo um saldo de dois moles de ATP por mol de glicose convertida a lactato

A síntese de ATP durante a glicólise é realizada por cinases que catalisam a **fosforilação em nível de substrato,** processo no qual um composto fosfatado de alta energia transfere seu fosfato para o ADP, gerando ATP.

Fosforilação em nível de substrato: $X \sim P + ADP \rightarrow X + ATP$

Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH)

A GAPDH catalisa uma reação redox, formando um composto acilfosfato de alta energia

Para atingir o estágio para a fosforilação em nível de substrato, o grupamento aldeído do gliceraldeído-3-fosfato é oxidado a ácido carboxílico e a energia disponível dessa reação de oxidação é utilizada, em parte, para capturar um fosfato do meio citoplasmático como um acilfosfato. Essa reação é catalisada pela gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), gerando um composto de alta energia (X~P), o 1,3-bisfosfoglicerato (1,3-BPG). A coenzima NAD^+ é simultaneamente reduzida a NADH (Figs. 12.4 e 12.5).

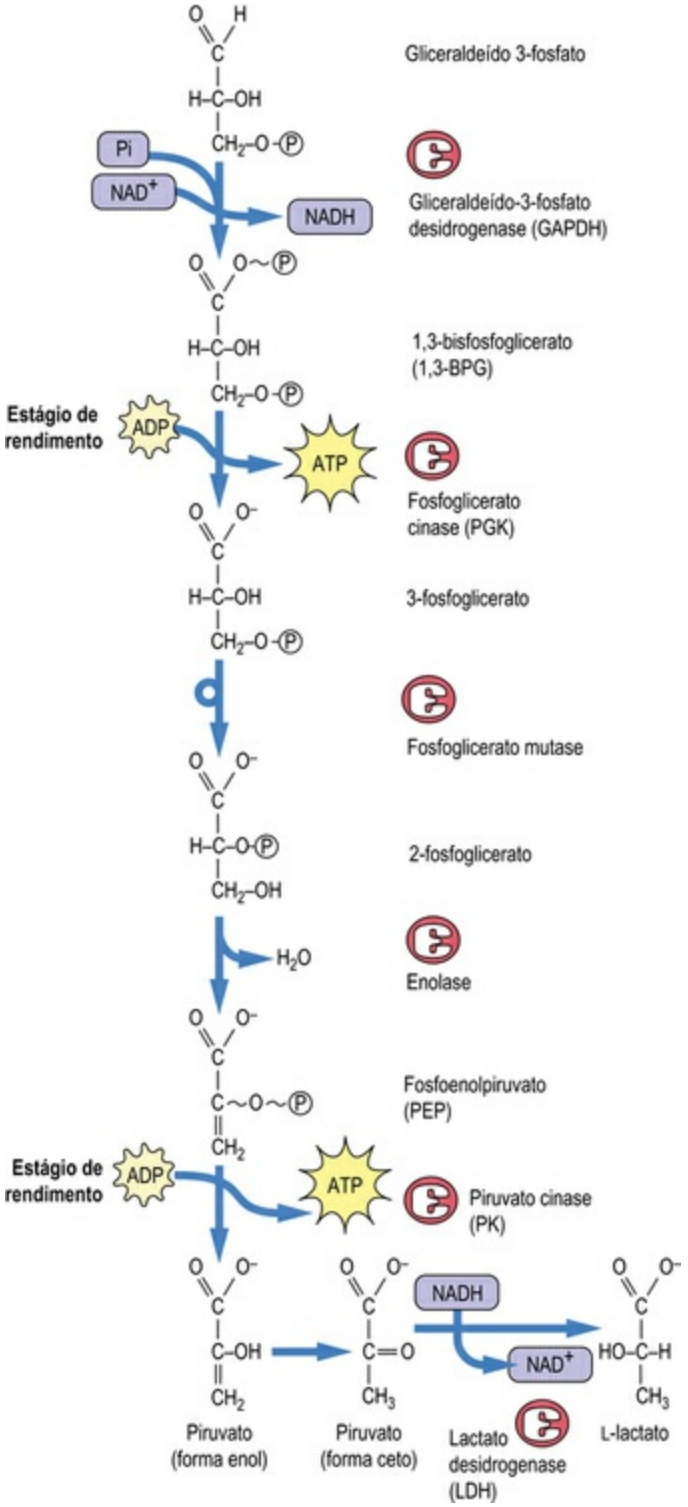


FIG. 12.4 O estágio de rendimento da glicólise.
As reações de fosforilação em nível de substrato catalisadas pela fosfoglicerato cinase e piruvato cinase produzem ATP, utilizando compostos de alta energia, 1,3-bisfosfoglicerato e fosfoenolpiruvato, respectivamente. Observe que o NADH produzido durante a reação da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase é convertido de volta a NAD^+ durante a reação da lactato desidrogenase, permitindo a continuação da glicólise na presença de quantidades somente catalíticas de NAD^+.

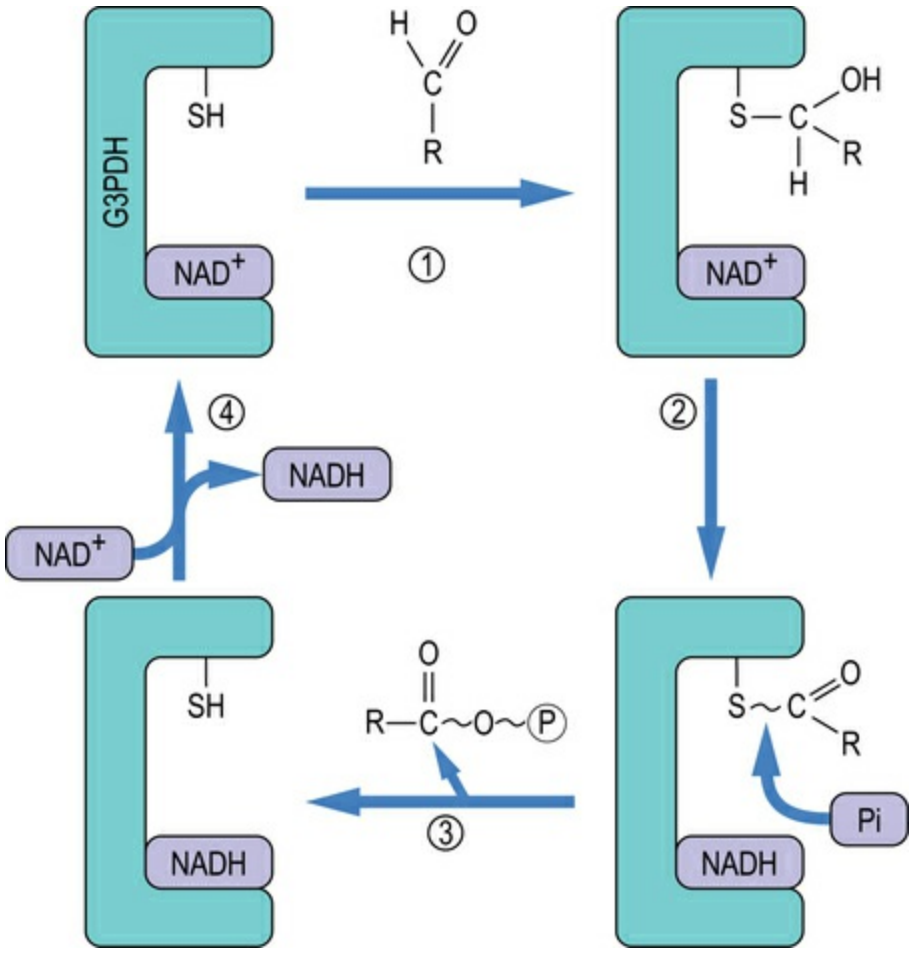


FIG. 12.5 Mecanismo da reação da gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH). No Passo 1, o gliceraldeído-3-P (RCHO) reage com o grupo sulfidrila do sítio ativo da GAPDH, formando um aduto tiohemiacetal. No Passo 2, o tiohemiacetal é oxidado a um tioéster pelo NAD^+, o qual está ligado no sítio ativo da enzima e é reduzido a NADH. No Passo 3, o fosfato entra no sítio ativo e, em uma reação de fosforilase, quebra a ligação carbono-enxofre, deslocando o grupo 3-fosfoglicerato, produzindo 1,3-bifosfoglicerato e regenerando o grupo sulfidrila. No Passo 4, a enzima troca o NADH por NAD^+, completando o ciclo catalítico.

A reação da GAPDH proporciona uma explicação interessante do papel dos intermediários ligados às enzimas na formação de fosfatos de alta energia. Como a oxidação de um aldeído e a redução de um NAD+ leva à formação de uma ligação acilfosfato no 1,3-BPG? Como o fosfato entra na molécula e se torna ativado a um estado de alta energia? A inibição da GAPDH pelos reagentes tios, tais como iodoacetamida, *p*-cloromercuriobenzoato e *N*-etilmaleimida, apontaram a participação de um resíduo sulfidrila no sítio ativo da enzima. O mecanismo de ação dessa enzima é descrito na Figura 12.5.

Fosforilação em nível de substrato

A fosforilação em nível de substrato produz ATP a partir de outro composto fosfato de alta energia

A fosfoglicerato cinase (PGK) catalisa a transferência do grupamento fosfato de alta energia acilfosfato do 1,3-BPG para o ADP, formando ATP. Essa reação de fosforilação em nível de substrato rende o primeiro ATP produzido na glicólise. O grupamento fosfato remanescente no 3-fosfoglicerato é um éster fosfato e não tem energia suficiente para

fosforilar o ADP, então uma série de reações de isomerização e desidratação é necessária para converter o fosfoéster a um fosfoenol de alta energia. A primeira etapa é deslocar o fosfato para o C-2 do glicerato, convertendo 3-fosfoglicerato em 2-fosfoglicerato, reação catalisada pela enzima fosfoglicerato mutase (Fig. 12.4). **As mutases catalisam a transferência de grupamentos funcionais dentro de uma mesma molécula.** A fosfoglicerato mutase tem um resíduo de histidina no sítio ativo, e um aduto de fosfo-histidina é formado como um intermediário ligado à enzima durante a reação de transferência do fosfato.

O 2-fosfoglicerato sofre então uma reação de desidratação catalisada pela enolase, uma hidratase, que rende um composto fosfatado de alta energia, o fosfoenolpiruvato (PEP). O PEP é o substrato da piruvato cinase para fosforilar um ADP, gerando piruvato e o segundo ATP, novamente através da fosforilação em nível de substrato. Parece estranho que a ligação do fosfato de alta energia no PEP possa ser formada a partir de um composto fosfatado de baixa energia, o 2-fosfoglicerato, por uma simples sequência de reações de isomerização e desidratação. Entretanto, a força motriz termodinâmica para essas reações é derivada provavelmente da repulsão das cargas entre o fosfato e os grupamentos carboxilados do 2-fosfoglicerato, e a isomerização do enolpiruvato a piruvato seguinte à reação de fosforilação.



Quadro de conceitos avançados

Inibição da fosforilação em nível de substrato pelo arsenato

O arsênico se encontra logo abaixo do fósforo na Tabela Periódica dos Elementos, e já deveria ser esperado que compartilhe algumas propriedades e reatividades do fosfato. Na verdade, o arsenato tem valores de pK_a similares aos do fosfato e pode efetivamente ser utilizado pela GAPDH, produzindo 1-arsenato-3-fosfoglicerato. Entretanto, a ligação acil-arsenato é instável e rapidamente hidrolisada e, assim, não gera ATP por fosforilação em nível de substrato. Embora o arsenato não iniba qualquer uma das enzimas da glicólise, ele dissipa a energia redox disponível a partir da reação da GAPDH e impede a formação de ATP por fosforilação em nível de substrato na reação da PKG. Na verdade, o arsenato *desacopla* as reações da GAPDH e da PGK. Observe que o arsênico e o arsenito também são tóxicos, mas possuem mecanismo de ação diferente: eles reagem irreversivelmente com grupamentos tiol em enzimas com sulfidrila, tais como GAPDH (Fig. 12.5), inibindo sua atividade irreversivelmente.



Quadro de teste clínico

Inibição da enolase pelo fluoreto

As dosagens de concentração da glicose sanguínea são usadas no diagnóstico e no acompanhamento do diabetes. Frequentemente, essas dosagens são realizadas em laboratório clínico mais de uma hora após a coleta da amostra de sangue. Já que as

hemácias são capazes de metabolizar a glicose a lactato, mesmo em recipientes selados e anóxicos, a glicose no sangue será consumida e o lactato será produzido, o que leva à acidificação da amostra sanguínea. Essas reações ocorrem nas CVS, mesmo em temperatura ambiente, de modo que a concentração de glicose e o pH diminuem durante a espera da amostra, possivelmente levando a um falso diagnóstico de hipoglicemia e acidemia.

O metabolismo anaeróbico da glicose pode ser impedido pela adição de um inibidor da glicólise no tubo de coleta da amostra de sangue. Reagentes sulfidrila podem agir, já que são inibidores da GAPDH; entretanto, a maior parte das amostras de sangue é coletada com pequena quantidade de um reagente muito barato, o fluoreto de sódio, no tubo de coleta da amostra. O fluoreto é um forte inibidor competitivo da enolase, bloqueando a glicólise e a produção de lactato na CVS. É um inibidor competitivo incomum, já que o fluoreto apresenta pouca semelhança com o 2-fosfoglicerato. Nesse caso, o fluoreto forma um complexo com o fosfato e o Mg^{2+} no sítio ativo da enzima, bloqueando o acesso do substrato.



Quadro clínico

Deficiência em piruvato cinase

Uma criança apresentou icterícia e sensibilidade abdominal, que se desenvolveu após um forte resfriado. Testes de laboratório revelaram baixo hematócrito, baixa concentração de hemoglobina, eritrócitos normocrômicos com morfologia normal e reticulocitose branda. A bilirrubina sérica estava aumentada.

Comentário

A deficiência de piruvato cinase é a anemia hemolítica mais comum que resulta da deficiência de uma enzima glicolítica. É um distúrbio autossômico recessivo que ocorre com uma frequência de 1/10.000 (frequência gênica de ~1%) na população mundial. Fica em segundo lugar apenas em relação à deficiência de G6PDH (ver adiante) como causa enzimática de anemia hemolítica. Essas doenças são diagnosticadas pela dosagem dos níveis enzimáticos ou de metabólitos nos eritrócitos, demonstrando anormalidades nas atividades enzimáticas, ou por análise genética. Instabilidade térmica, aumento da K_m para o PEP e decréscimo da ativação pela Fru-1,6-BP caracterizam defeitos enzimáticos da piruvato cinase.

A deficiência de piruvato cinase varia significativamente em gravidade, desde uma condição leve, compensada, que requer pequenas intervenções a uma doença grave que requer transfusões. A anemia resulta da incapacidade de sintetizar ATP, necessário para a manutenção do metabolismo das CVS, dos gradientes iônicos e da forma da célula. Curiosamente, os pacientes podem tolerar a anemia muito bem. Mesmo com anemia branda, o acúmulo de 2,3-bisfosfoglicerato em suas CVS diminui a afinidade do oxigênio pela hemoglobina, promovendo a liberação de oxigênio para o músculo durante o exercício e até mesmo para o feto durante a gravidez.

A fosfoglicerato cinase e a piruvato cinase catalisam as reações de fosforilação em nível de substrato

As reações que geram ATP na glicólise produzem dois moles de ATP por mol de triose fosfato ou um total de quatro moles por mol de Fru-1,6-BP. Após o ajuste para o ATP investido nas reações da hexocinase e da PFK-1, o saldo líquido final é de 2 moles de ATP por mol de glicose convertido a piruvato.

Lactato desidrogenase (LDH)

A LDH regenera o NAD^+ consumido na reação da GAPDH, produzindo lactato, o produto final da glicólise anaeróbica

Duas moléculas de piruvato possuem exatamente o mesmo número de carbonos e oxigênios que uma molécula de glicose, entretanto há um déficit de quatro hidrogênios — cada piruvato tem quatro hidrogênios, um total de oito hidrogênios para dois piruvatos, comparado com 12 em uma molécula de glicose. A "perda" desses quatro hidrogênios aparece na forma de 2NADH e $2H^+$ formados na reação da GAPDH. Já que o NAD^+ está presente somente em quantidades catalíticas dentro da célula e é um cofator essencial para a glicólise (e outras reações), deve haver um mecanismo para a regeneração de NAD^+ para que a glicólise continue.

A oxidação do NADH é realizada sob condições anaeróbicas pela lactato desidrogenase (LDH), enzima que catalisa a redução do piruvato a lactato pelo NADH + H^+, regenerando o NAD^+. Em mamíferos, todas as células possuem a LDH, e o lactato é o produto final da glicólise sob condições anaeróbicas. Sob condições aeróbicas, a mitocôndria oxida o NADH a NAD^+ e converte o piruvato a CO_2 e H_2O, assim o lactato não é formado. Apesar de possuir capacidade de realizar o metabolismo oxidativo, algumas células às vezes podem se tornar "glicolíticas" formando lactato, como, por exemplo, no músculo durante um débito de oxigênio, em fagócitos existentes no pus ou em tecidos pobremente irrigados. A maior parte do lactato excretado para o sangue é recuperada pelo fígado para ser usada como substrato para a gliconeogênese (Cap. 13).

Fermentação

A fermentação é um termo geral para o metabolismo anaeróbico da glicose, normalmente aplicado a organismos unicelulares

Algumas bactérias anaeróbicas, como os lactobacilos, produzem lactato, enquanto outras possuem vias alternativas para a oxidação anaeróbica do NADH formado durante a glicólise. Durante a fermentação em leveduras, a via glicolítica é idêntica à das CVS, exceto pela conversão do piruvato a etanol (Fig. 12.6). O piruvato é primeiramente descarboxilado pela piruvato descarboxilase a acetaldeído, liberando CO_2. O NADH produzido na reação da GAPDH é então reoxidado pela álcool desidrogenase, regenerando o NAD^+ e produzindo etanol. O etanol é um composto tóxico, e a maioria

das leveduras morre quando a concentração de etanol no meio atinge cerca de 12%, a concentração aproximada de álcool em vinhos naturais. As bebidas alcoólicas são uma fonte rica em energia; o álcool fornece aproximadamente 7 kcal/g (29 kJ/g) através de metabolismo aeróbico (Tabela 9.1), ocupando uma posição intermédia entre os carboidratos e os lipídios. Enquanto alimento, as bebidas alcoólicas são mais estáveis ao armazenamento a longo prazo, comparadas com as frutas e os vegetais a partir dos quais são produzidas. A cerveja, o vinho, a cidra e o hidromel fornecem igualmente quantidades variáveis de vitaminas, minerais, fitoquímicos e xenobióticos.

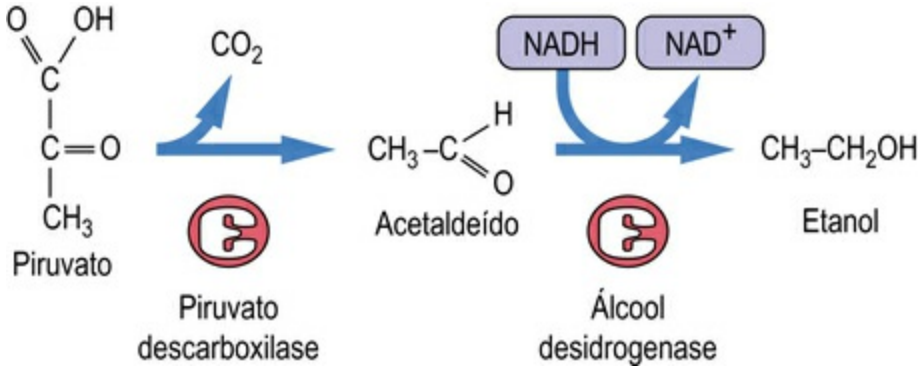


FIG. 12.6 Glicólise anaeróbica em leveduras. Formação do etanol pela glicólise anaeróbica durante a fermentação. O piruvato é descarboxilado pela piruvato descarboxilase, produzindo acetaldeído e CO_2. A álcool desidrogenase usa o NADH para reduzir o acetaldeído a etanol, regenerando o NAD^+ para a glicólise.

Quadro clínico

Glicólise e cáries dentárias

Streptococcus mutans e *lactobacillus* são bactérias anaeróbicas que colonizam a cavidade oral e contribuem para o desenvolvimento de cáries dentárias. Essas bactérias crescem otimamente em carboidratos refinados e fermentáveis da dieta e excretam ácidos orgânicos, tais como o lactato. Elas se desenvolvem em microambientes acidificados e anaeróbicos de fissuras nos dentes e nas bolsas gengivais. Os ácidos orgânicos gradualmente erodem o esmalte do dente e a dentina, e a dissolução crônica da matriz de fosfato de cálcio (hidroxiapatita) do dente leva ao estágio de formação de uma cavidade. O fluoreto, administrado topicamente ou presente na pasta de dente, em níveis tão baixos que conseguem inibir a enolase, integra-se à superfície do dente, formando fluoroapatita, a qual é mais resistente à desmineralização.

Outros produtos alimentares fermentados, que se estima representarem um terço de todos os alimentos consumidos por seres humanos em todo o mundo, incluem picles, chucrute, leitelho, iogurte, salsicha, alguns peixes e carnes, pão, queijo e vários molhos e condimentos — até o café e o chocolate. O ambiente acídico produzido durante a

fermentação limita a deterioração e o crescimento de microrganismos patogênicos. A fermentação também pré-digere e aumenta a digestibilidade dos alimentos, por vezes melhora seu valor nutricional adicionando vitaminas derivadas de bactérias, e invariavelmente contribui para o sabor e aroma dos gêneros alimentícios.

Existem em torno de 1.000 espécies de bactérias anaeróbicas em nossos intestinos. Estas enterobactérias sobrevivem em uma relação simbiótica com o homem. Auxiliam significativamente na digestão e extração de energia dos gêneros alimentícios, são uma fonte de biotina e de vitamina K, proporcionam proteção contra infecção por patogênios e promovem o peristaltismo gastrintestinal. A distribuição de espécies também se altera em resposta ao conteúdo de carboidratos, gorduras e proteínas de nossa dieta.

Regulação da glicólise em eritrócitos

A glicólise é regulada alostericamente em três reações de cinases

Hexocinase

As CVS consomem a glicose de maneira estável e uniforme. Elas não são fisicamente ativas como o músculo e não requerem energia para transportar O_2 ou CO_2. A glicólise nas hemácias parece ser regulada simplesmente pela necessidade de energia da célula, primeiramente para a manutenção de gradientes iônicos. O balanço entre o consumo e a produção de ATP é controlado alostericamente em três sítios: nas reações da **hexocinase, fosfofrutocinase-1 e piruvato cinase** (Fig. 12.2). De acordo com a determinação da $V^{máx}$ de várias enzimas em lisados de CVS *in vitro*, a hexocinase apresenta a menor atividade de todas as enzimas glicolíticas. Sua atividade máxima é cerca de cinco vezes a taxa do consumo de glicose pelas CVS, porém está sujeita a uma inibição por *feedback* (alostérica) do seu produto, a Glc-6-P. A hexocinase apresenta 30% de homologia entre seus domínios *N*- e *C*-terminal, resultado da duplicação e fusão do gene original; a ligação a Glc-6-P ao domínio *N*-terminal inibe a atividade da enzima e a produção de Glc-6-P no sítio ativo do domínio *C*-terminal.

Fosfofrutocinase-1 (PFK-1)

A PFK-1 é o primeiro ponto de regulação da glicólise

A PFK-1 é o local primário de regulação da glicólise, do fluxo de Fru-6-P para Fru-1,6-BP e, indiretamente através da reação da fosfoglicose isomerase, do nível de Glc-6-P e da inibição da hexocinase. Embora apresente atividade 20 vezes superior à da hexocinase, a PFK-1 é fortemente inibida por ATP, de modo que sua atividade varia com o estado energético da célula. Surpreendentemente, o ATP tanto é substrato (Fig. 12.3) quanto inibidor alostérico (Fig. 12.7) da PFK-1, uma função dupla que permite o controle fino sobre a atividade da enzima.

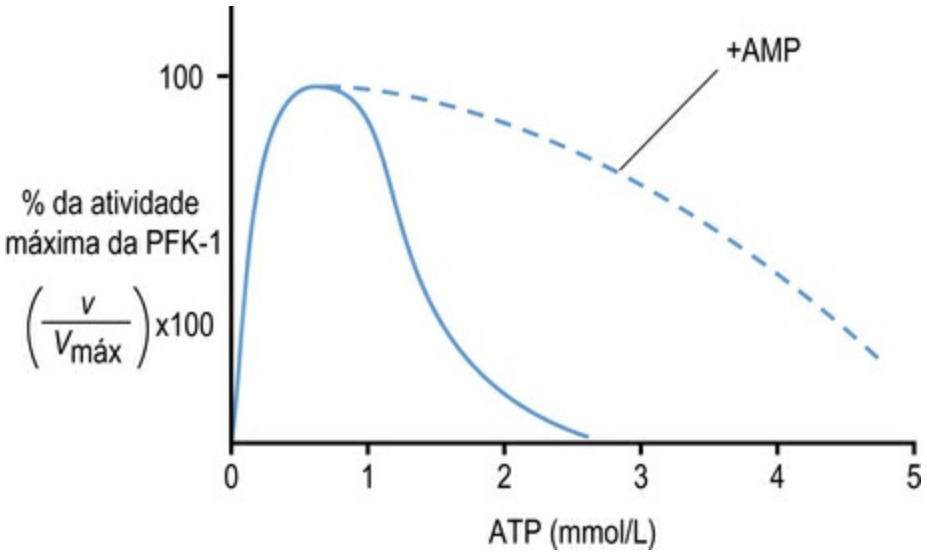


FIG. 12.7 Regulação alostérica da fosfofrutocinase-1 (PFK-1) pelo ATP. O AMP é um potente ativador da PFK-1 na presença de ATP.

Conforme mostrado na Figura 12.7, a concentração de ATP nas CVS (~2 mmol/L) normalmente reprime a atividade da PFK-1. O AMP, que está presente em concentrações muito menores (~0,05 mmol/L), atenua essa inibição. Por causa de suas concentrações relativas, a conversão de uma pequena fração de ATP a AMP nas CVS gera grande aumento relativo da concentração do AMP, o que ativa a PFK-1. O ADP também atenua a inibição da PFK-1 pelo ATP, porém sua concentração não se altera tanto com a utilização de energia. O AMP (e o ADP) não só atenua a inibição da PFK-1 pelo ATP, como também diminui a *K*m para o substrato Fru-6-P, aumentando ainda mais a eficiência catalítica dessa enzima.

Como medido pelas concentrações relativas de ATP, ADP e AMP, a atividade da PFK-1 nas hemácias é seletivamente sensível a mudanças no estado energético da célula através de regulação alostérica. Na realidade, a atividade total da PFK-1 e, portanto, a velocidade da glicólise, depende da relação de concentrações (AMP + ADP)/ATP na célula. Esses produtos são interconversíveis pela reação da adenilato cinase:

$$2\,\mathrm{ADP} \rightleftarrows \mathrm{ATP} + \mathrm{AMP}$$

Quando o ATP é consumido e o ADP aumenta, o AMP é formado pela reação da adenilato cinase. O aumento das concentrações de AMP atenua a inibição da PFK-1 pelo ATP, ativando a glicólise. A fosforilação do ADP durante a glicólise e do AMP pela reação da adenilato cinase gradualmente restaura a concentração de ATP ou a **carga energética** da célula e, à medida que a concentração de AMP diminui, a taxa de glicose decresce a um estado estacionário. A glicólise atua sob uma taxa constante e favorável na hemácia, onde o consumo de ATP é estável, porém a atividade dessa via muda rapidamente em resposta à utilização de ATP no músculo durante o exercício.

Piruvato cinase (PK)

Além da regulação pela hexocinase e PFK-1, a piruvato cinase no fígado é alostericamente ativada por Fru-1,6-BP, o produto da reação da PFK-1. Esse processo pode ser importante nos eritrócitos para limitar o acúmulo de intermediários do tipo trioses fosfato quimicamente reativos no citosol.

Características das enzimas regulatórias

Cada uma das três enzimas envolvidas na regulação da glicólise — hexocinase, PFK-1 e piruvato cinase — tem os traços característicos de uma enzima regulatória: elas são enzimas diméricas ou tetraméricas cujas estruturas e atividades são responsivas a moduladores alostéricos; estão presentes com baixas $V_{máx}$ em comparação com outras enzimas da via e catalisam reações irreversíveis.



Quadro clínico

Glicólise em células tumorais

Os tumores são frequentemente "glicolíticos", isto é, apresentam aumento na dependência da glicólise como fonte de energia. O aumento da glicólise pode ser resultado da inibição da fosforilação oxidativa mitocondrial como consequência de hipóxia, possivelmente por causa da necessidade metabólica das rápidas divisões das células tumorais, excedendo assim o suprimento de oxigênio e nutrientes a partir do sangue. Nesses casos, a produção e o acúmulo de lactato se tornam tóxicos para as células tumorais, contribuindo para a necrose e a formação de núcleo necrótico no tumor.

Alguns tumores secretam citocinas que promovem angiogênese (formação de novos vasos sanguíneos), aumentando desse modo o fornecimento de combustível, e assim levando a um aumento do crescimento do tumor. Inibidores de angiogênese, desenvolvidos para inibir a vascularização do tumor, estão sendo avaliados como alternativas não cirúrgicas para a terapia do tumor. A capacidade de sobrevivência por manterem a glicólise em meios hipóxicos pode ser um fator importante no crescimento e sobrevivência do tumor.

A regulação da glicólise no fígado, no músculo e em outros tecidos é mais complicada do que nas CVS (Tabela 12.1) em função da maior variabilidade na taxa de consumo de combustível e da interação entre o metabolismo de carboidratos e de lipídios durante o metabolismo aeróbico. Nesses tecidos, a quantidade e a atividade das enzimas regulatórias são reguladas pelos seus efetores alostéricos através de modificações covalentes e por indução ou repressão da atividade enzimática.

Tabela 12.1

Regulação da glicólise na hemácia

Enzima	Regulador
Hexocinase	Inibida por glicose-6-fosfato
Fosfofrutocinase-1	Inibida por ATP; ativada por AMP
Piruvato cinase	Ativada por frutose-1,6-BP

Síntese de 2,3-bisfosfoglicerato (2,3-BPG)

O 2,3-BPG é um efetor alostérico negativo da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio

O 2,3-bisfosfoglicerato (Fig. 12.8) é um importante produto da glicólise nas CVS, às vezes atingindo a concentração de 5 mmol/L, a qual é comparável à concentração molar de hemoglobina (Hb) na CVS. O 2,3-BPG é o principal intermediário fosforilado no eritrócito, presente até em maiores concentrações do que o ATP (1-2 mmol/L) ou o fosfato inorgânico (1 mmol/L). O 2,3-bisfosfoglicerato é um efetor alostérico negativo da afinidade da Hb pelo O_2. Ele diminui a afinidade da hemoglobina pelo O_2 promovendo a liberação de O_2 nos tecidos periféricos. A presença de 2,3-BPG nas CVS explica a observação de que a afinidade pelo O_2 da HbA purificada é maior do que a da Hb nas CVS. A concentração de 2,3-BPG aumenta nas CVS durante a adaptação a grandes altitudes, em doença pulmonar obstrutiva crônica e na anemia, promovendo a liberação de O_2 para os tecidos quando a tensão de O_2 e a saturação da hemoglobina diminuem no pulmão. **A Hb fetal (HbF) é menos sensível do que a Hb de um adulto (HbA) aos efeitos do 2,3-BPG;** a maior afinidade pelo oxigênio da HbF, mesmo na presença de 2,3-BPG, promove uma transferência eficiente de O_2 através da placenta da HbA para a HbF (Cap. 5).

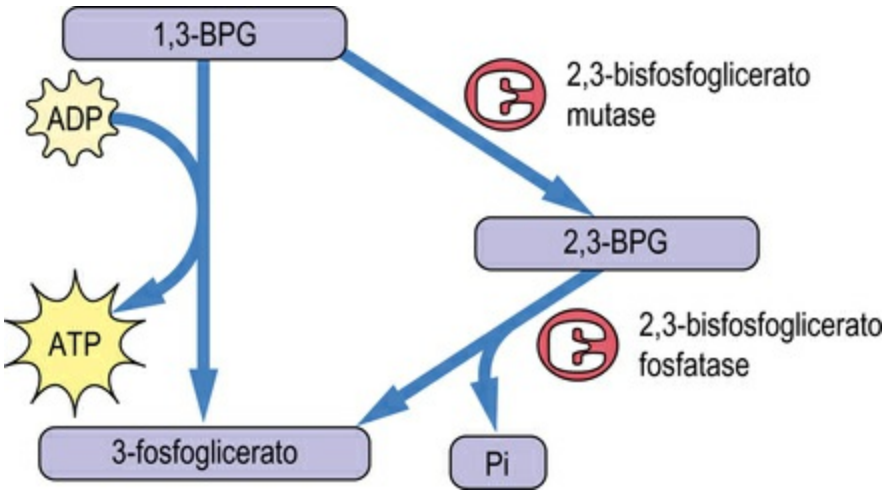


FIG. 12.8 Via para biossíntese e degradação do 2,3-bisfosfoglicerato (2,3-BPG). A BPG mutase catalisa a conversão de 1,3-BPG em 2,3-BPG. Essa mesma enzima tem atividade de bisfosfoglicerato fosfatase, controlando assim tanto a síntese quanto a hidrólise do 2,3-BPG. Observe que essa via desvia a reação da fosfoglicerato cinase, de modo que a geração de ATP por mol de glicose é diminuída a zero.

A via das pentoses fosfato

Visão geral

A via das pentoses fosfato é a fonte de ribose fosfato para a síntese de RNA e DNA

A via das pentoses fosfato é uma via citosólica presente em todas as células, assim chamada por ser a via principal de formação de pentoses fosfato para síntese de nucleotídios e posterior incorporação ao DNA e RNA (Cap. 30). Essa via se ramifica a partir da glicólise na etapa de formação da Glc-6-P, daí a sua designação alternativa, de desvio da hexose monofosfato. A via das pentoses fosfato é, às vezes, mais bem descrita como um desvio do que como uma via porque, quando as pentoses não são necessárias para reações biossintéticas, os intermediários das pentoses fosfato são reciclados para a glicólise através da conversão em Fru-6-P e gliceraldeído-3-fosfato. Esse redirecionamento é especialmente importante nas CVS e em células quiescentes que não estão dividindo, em que há necessidade limitada da síntese de DNA e RNA.

O NADPH é o principal produto da via das pentoses fosfato em todas as células

Em tecidos que têm biossíntese ativa de lipídios (p. ex., o fígado, o córtex adrenal ou as glândulas mamárias), o NADPH é usado em reações redox necessárias para a biossíntese de colesterol, sais biliares, hormônios esteroides e triglicerídios. O fígado também utiliza NADPH para reações de hidroxilação envolvidas na desintoxicação e excreção de fármacos. As CVS têm pequena atividade biossintética, mas ainda assim desviam cerca de 10% da glicose para a via das pentoses fosfato, nesse caso quase exclusivamente para a produção de NADPH. O NADPH é usado principalmente para a redução de um tripeptídio contendo cisteína, a glutationa (GSH), um cofator essencial para a proteção antioxidante (Cap. 37).

A via das pentoses fosfato é dividida em um estágio redox irreversível, o qual gera

tanto NADPH quanto pentoses fosfato, e em um estágio de interconversão reversível, no qual o excesso de pentoses fosfato é convertido em intermediários da via glicolítica. Ambos os estágios são importantes nas CVS, já que elas necessitam do NADPH para redução da glutationa, mas necessidade limitada para a síntese *"de novo"* de pentoses.

O estágio redox da via das pentoses fosfato síntese de nadph

O NADPH é sintetizado por duas desidrogenases, na primeira e na terceira reação da via das pentoses fosfato (Fig. 12.9). Na primeira etapa da via, a reação da Glc-6-P desidrogenase (G6PDH) produz NADPH pela oxidação da Glc-6-P a ácido 6-fosfoglicônico lactona, um éster de açúcar cíclico. A lactona é hidrolisada a ácido 6-fosfoglicônico pela lactonase. A descarboxilação oxidativa do 6-fosfogliconato, catalisada pela 6-fosfogliconato desidrogenase, gera uma cetose, a ribulose-5-fosfato, mais 1 mol de CO_2 e o segundo mol de NADPH.

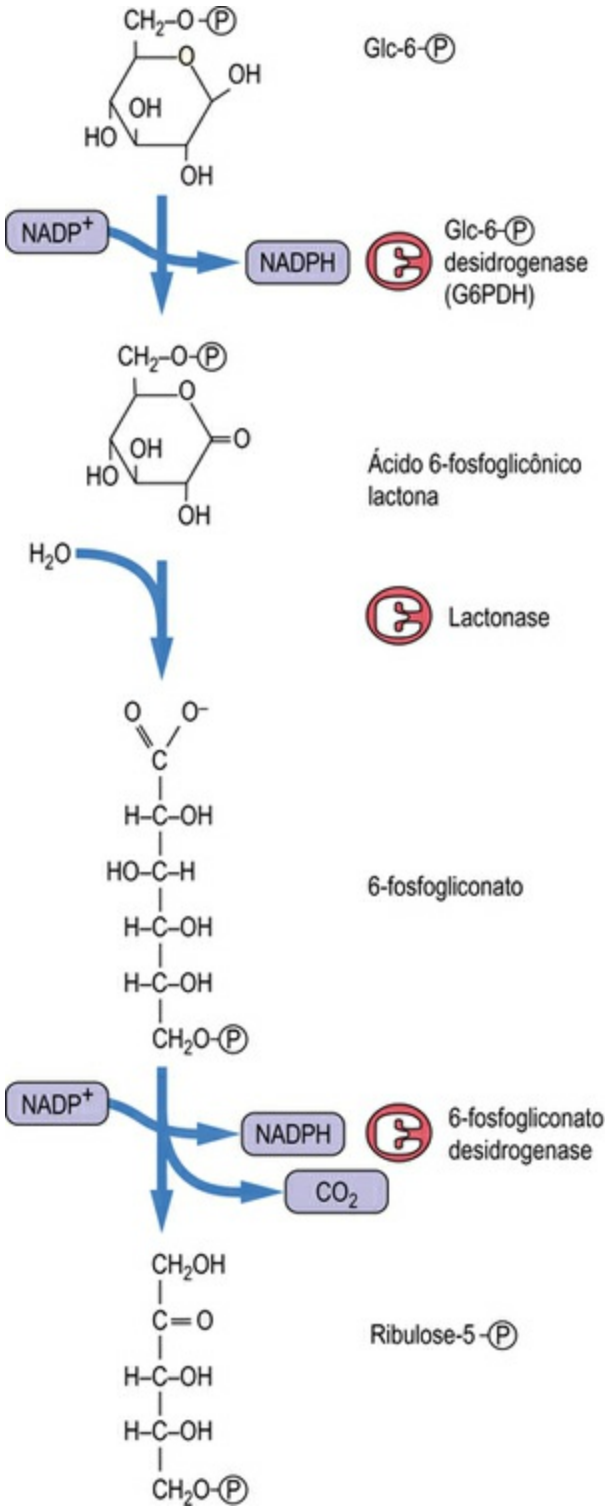


FIG. 12.9 O estágio redox da via das pentoses fosfato. Uma sequência de três enzimas forma dois moles de NADPH por mol de Glc-6-P, o qual é convertido a ribulose-5-fosfato com liberação de CO_2.

A G6PDH e a 6-fosfogliconato desidrogenase mantêm a relação citoplasmática de NADPH/NAD^+ em aproximadamente 100. Curiosamente, já que o NAD^+ é necessário para a glicólise, a taxa de NADH/NAD^+ no citoplasma é próxima do inverso, menos de 0,01. Embora as concentrações totais (formas oxidadas mais as reduzidas) de NAD(H) e NADP(H) nas CVS sejam similares (~25 μmol/L), a célula mantém esses dois sistemas redox com potenciais redox parecidos em diferentes pontos na mesma célula através do isolamento do seu metabolismo pela especificidade das desidrogenases citoplasmáticas. **As enzimas glicolitícas (GAPDH e LDH) utilizam somente o NAD(H), enquanto as enzimas da via das pentoses fosfato utilizam somente NADP(H).** Não existem enzimas

nas CVS que catalisem a redução do NAD^+ pelo NADPH, de tal forma que podem existir simultaneamente no mesmo compartimento níveis elevados de NAD^+ e de NADPH.

O estágio de interconversão da via das pentose-fosfato

Em células com síntese ativa de ácidos nucleicos, a ribulose-5-fosfato formada a partir da reação da 6-fosfogliconato desidrogenase, é isomerizada a ribose 5-fosfato para a síntese de ribo e desoxirribonucleotídios para a formação de RNA e DNA (Fig. 12.10). No entanto, em células que não estão em divisão, as pentoses fosfato voltam para a glicólise. Isso acontece por uma série de reações de equilíbrio na qual três moles de ribulose-5-fosfato são convertidos a dois moles de Fru-6-P e um mol de gliceraldeído-3-fosfato. Certas restrições são impostas nas reações de interconversão — elas devem ser executadas somente pela transferência de duas ou três unidades de carbono entre os açúcares fosfato. Cada reação deve também envolver uma cetose doadora e uma aldose receptora. Isomerases e epimerases convertem a ribulose-5-fosfato em substratos aldose e cetose-fosfato para o estágio de interconversão. **A transcetolase, uma enzima dependente de timina,** catalisa as reações de transferência de dois carbonos. A **transaldolase** age de forma similar à aldolase na glicólise, exceto pelo fato de que a unidade de três carbonos é transferida a outro açúcar, em vez de ser liberado como uma triose fosfato para a glicólise.

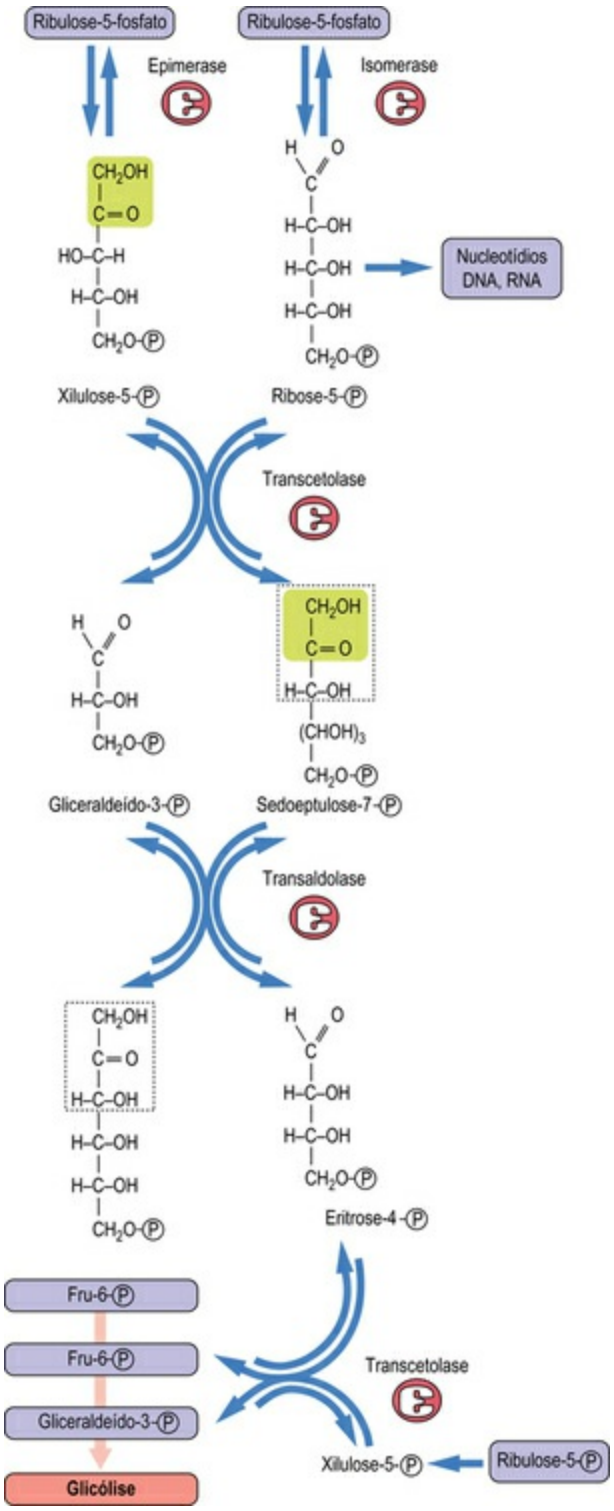


FIG. 12.10 O estágio de interconversão da via das pentoses fosfato. Os esqueletos carbônicos de três moléculas de ribulose-5-fosfato são desviados para formar duas moléculas de Fru-6-P e uma molécula de gliceraldeído-3-fosfato, os quais entram na via glicolítica.

Como mostrado na Figura 12.10 e na Tabela 12.2, duas moléculas de ribulose-5-fosfato, o primeiro produto pentose do estágio redox, são convertidas em produtos separados: uma molécula é isomerizada a uma aldose, a ribose-5-fosfato, e a outra sofre epimerização à xilulose-5-fosfato. A transcetolase catalisa então a transferência de dois carbonos da xilulose-5-fosfato para a ribose-5-fosfato, resultando em uma cetose de sete carbonos, a sedoeptulose-7-fosfato, e em um açúcar de três carbonos, o gliceraldeído-3-fosfato. A transaldolase, por sua vez, catalisa a transferência de três carbonos entre os dois produtos da transcetolase, da sedoeptulose-7-fosfato para o gliceraldeído-3-fosfato,

resultando no primeiro intermediário da via glicolítica, a Fru-6-fosfato, e em uma eritrose-4-fosfato residual. Uma terceira molécula de xilulose-5-fosfato dos dois carbonos para a eritrose-4-fosfato em uma segunda reação da transcetolase, gerando uma segunda molécula de Fru-6-P e uma molécula de gliceraldeído-3-fosfato, e ambas entram na via glicolítica.

Tabela 12.2

Resumo das reações de equilíbrio na via das pentoses fosfato

Substrato(s)		Produto(s)	Enzima
Ribulose-5-P	⇆	Ribose-5-P	Isomerase
2-Ribulose-5-P	⇆	2-Xilulose-5-P	Epimerase
Xilulose-5-P + Ribose-5-P	⇆	Gliceraldeído-3-P + Sedoeptulose-7-P	Transcetolase
Sedoeptulose-7-P + Gliceraldeído-3-P	⇆	Eritrose-4-P + Frutose-6-P	Transaldolase
Xilulose-5-P + Eritrose-4-P	⇆	Gliceraldeído-3-P + Frutose-6-P	Transcetolase
3 Ribulose-5-P	⇆	**Gliceraldeído-3-P + 2-Frutose-6-P**	**RESUMO**

Assim, três açúcares fosfato de cinco carbonos (ribulose-5-fosfato) formados no estágio redox da via das pentoses fosfato são convertidos em intermediários da glicólise, sendo um com três carbonos (gliceraldeído-3-fosfato) e dois com seis carbonos (frutose-6-fosfato). Nas CVS, esses intermediários da via glicolítica continuam a via gerando lactato, mostrando que a glicose é só temporariamente desviada da via central da glicólise.

Função antioxidante da via das pentoses fosfato

A via das pentoses fosfato protege contra o dano oxidativo no eritrócito

A glutationa (GSH) é um tripeptídio γ-glutamil-cisteinil-glicina (Fig. 12.11). Está presente nas células na concentração de 2-5 mmol/L, sendo 99% na forma reduzida (tiol), e é uma coenzima essencial para a proteção da célula contra vários ataques oxidativos e químicos (Cap. 37). A maior parte do NADPH formado na hemácia é utilizada pela glutationa redutase para manter a GSH no estado reduzido. Durante sua função como coenzima para atividades antioxidantes, a GSH é oxidada à forma dissulfeto, GSSG, a qual é posteriormente regenerada pela ação da glutationa redutase (Fig. 12.12).

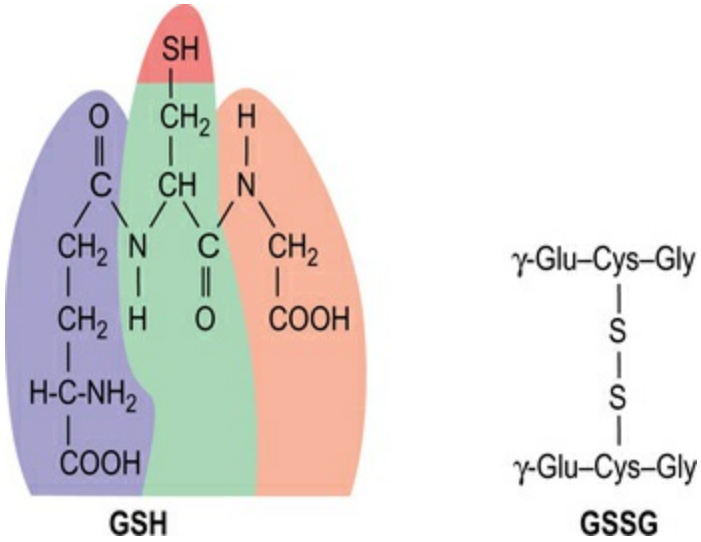


FIG. 12.11 Glutationa.
Estrutura da glutationa reduzida (GSH) e da glutationa oxidada (GSSG). Note a ligação isopeptídica entre o γ-carboxila, e não o α-carboxila, do ácido glutâmico e o grupo α-amina da cisteína.

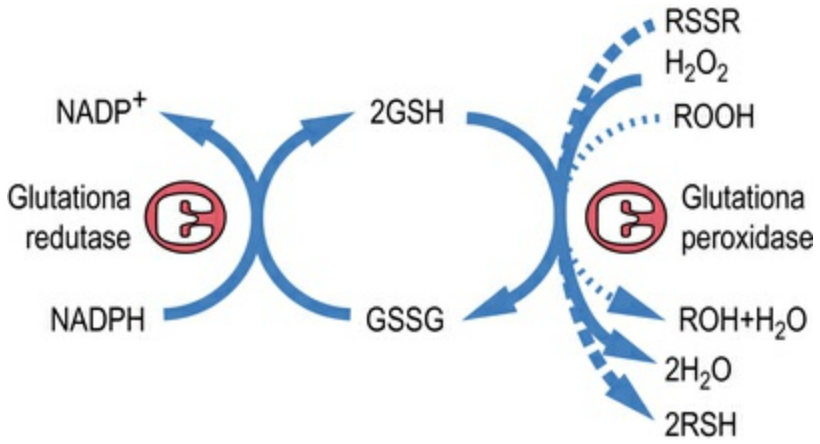


FIG. 12.12 Atividades antioxidantes da glutationa.
A GSH é a coenzima para a glutationa peroxidase, a qual desintoxica o peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos orgânicos (lipídios). O peróxido de hidrogênio e os peróxidos lipídicos são formados espontaneamente na hemácia, catalisado pela reação colateral do ferro hêmico durante o transporte de oxigênio pela hemoglobina (Cap. 37). A GSH também reduz pontes dissulfeto em proteínas (RSSR), formadas durante o estresse oxidativo (Cap. 37), regenerando a forma nativa da proteína (RSH).

A GSH tem uma variedade de funções protetoras na célula. A glutationa peroxidase (GPx) é encontrada em todas as células e utiliza a GSH para desintoxicação do peróxido de hidrogênio e peróxidos inorgânicos (lipídios) no citosol e nas membranas celulares (Fig. 12.12). Como a GPx contém um resíduo seleno-cisteína em seu sítio ativo, o selênio, o qual é necessário em pouca quantidade na dieta, é frequentemente descrito como um nutriente antioxidante (Cap. 11).

A GSH também age como um tampão sulfidrila intracelular, mantendo os grupamentos -SH expostos nas proteínas e enzimas no estado reduzido. Sob circunstâncias normais, quando as proteínas são expostas ao O_2, seus grupamentos sulfidrila livres gradualmente se oxidam para formar dissulfetos, formando ligações cruzadas intramoleculares ou intermoleculares com outras moléculas de proteínas. Na

hemácia, a GSH mantém os grupamentos -SH da hemoglobina no estado reduzido, inibindo as ligações cruzadas oxidativas da proteína.



Quadro clínico

A deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase causa anemia hemolítica

Logo antes de uma viagem planejada para os trópicos, um paciente visitou seu médico, reclamando de fraqueza e de que sua urina tornou-se inexplicavelmente escura recentemente. O exame médico revelou esclerótica levemente ictérica (amarela). Os testes de laboratório indicaram baixo hematócrito, alta contagem de reticulócitos e aumento significativo dos níveis sanguíneos de bilirrubina. O paciente se apresentara com boa saúde durante uma visita havia um mês, quando recebeu imunizações e prescrições para fármacos antimaláricos.

Comentário

Uma série de fármacos, particularmente a primaquina e os antimaláricos relacionados, sofrem reações redox na célula produzindo altas quantidades de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Cap. 38). As EROs causam oxidação dos grupamentos –SH na hemoglobina e peroxidação dos lipídios de membrana. Algumas pessoas têm um defeito genético na Glc-6-P desidrogenase (G6PDH), gerando uma enzima tipicamente instável, com meia-vida menor na CVS, ou extraordinariamente sensível à inibição pelo NADPH. Nos outros casos, a diminuição da atividade dessa enzima e a produção insuficiente de NADPH sob estresse diminuem a capacidade da célula de reciclar GSSG em GSH, e o estresse oxidativo induzido por fármacos leva ao dano excessivo e à lise das CVS (hemólise), além de anemia hemolítica. A bilirrubina, um produto do metabolismo do heme, sobrecarrega as vias da desintoxicação hepática, se acumulando no plasma e nos tecidos, causando icterícia. Se a hemólise é suficientemente grave, a Hb extravasa para a urina, resultando em hematúria e urina de coloração escura. Os corpos de Heinz, agregados de ligações cruzadas dissulfeto de hemoglobina também são aparentes nas amostras de sangue. A deficiência de G6PDH é assintomática, exceto em resposta a um desafio oxidativo, o qual pode ser induzido por fármacos (antimaláricos, sulfas), dieta (feijão de fava) ou infecções graves.

Existem cerca de 200 mutações conhecidas para o gene da *G6DPH*, gerando ampla variação na gravidade da doença. As CVS parecem ser especialmente sensíveis ao estresse oxidativo porque, diferentemente de outras células, não podem sintetizar nem substituir suas enzimas. As células mais velhas, que possuem menor atividade de G6PDH, são, portanto, particularmente afetadas. A atividade de todas as enzimas nas CVS diminui com o tempo, e a morte celular eventualmente resulta a partir da incapacidade das células de produzirem ATP suficiente para a manutenção de gradientes iônicos celulares. O decréscimo gradual na atividade da via das pentoses fosfato em células mais velhas é um mecanismo que leva às ligações cruzadas oxidativas das proteínas de membrana e ao aprisionamento e *turnover* dos eritrócitos

no baço.

Resumo

Este capítulo descreve duas vias metabólicas antigas comuns a todas as células do corpo: a glicólise e a via das pentoses fosfato. A hemácia, que não possui mitocôndrias e metabolismo oxidativo, e, portanto, obtém todo o seu ATP através da glicólise, é usada como modelo para a introdução dessas vias.

- A glicólise anaeróbica nas hemácias produz uma quantidade limitada de ATP pela conversão de um açúcar de seis carbonos, a glicose, em duas moléculas do hidroxiácido de três carbonos (lactato).
- Através de uma série de intermediários açúcares fosfatos, a glicólise fornece metabólitos para pontos de ramificação com outras vias metabólicas, incluindo a via das pentoses fosfato.
- A via das pentoses fosfato promove a geração de pentoses para a síntese de DNA e RNA em células nucleadas e NADPH para reações biossintéticas. O NADPH também é necessário para a manutenção da glutationa reduzida, que é um cofator essencial para os sistemas de defesa antioxidantes que protegem a célula contra o estresse oxidativo.

Questões para aprendizagem

1. Por que a glicose foi escolhida como açúcar sanguíneo durante a evolução, preferencialmente a outros açúcares, (p. ex., galactose, frutose ou sacarose)?
2. Descreva as reações enzimáticas acopladas, usando somente as enzimas das hemácias e um espectrofotômetro para dosar a produção ou consumo de NAD(P)(H), que podem ser usadas para dosar as concentrações de glicose sanguínea e lactato.
3. Explique a origem metabólica da acidose em doença pulmonar crônica obstrutiva.

Leituras sugeridas

Bar-Even, A., Flamholz, A., Noor, E., et al. Rethinking glycolysis: on the biochemical logic of metabolic pathways. *Nat Chem Biol*. 2012; 8:509–517.

Climent, F., Roset, F., Repiso, A., et al. Red cell glycolytic enzyme disorders caused by mutations: an update. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*. 2009; 9:95–106.

Granchi, C., Minutolo, F. Anticancer agents that counteract tumor glycolysis. *Chem Med Chem*. 2012; 7:1318–1350.

Katz, S. E. *The art of fermentation*. White River Junction, VT: Chelsea Green Publishing; 2012. [pp 498].

Krol, D. M., Nedley, M. P. Dental caries: state of the science for the most common chronic disease of childhood. *Adv Pediatr*. 2007; 54:215–239.

Nicholson, J. K., Holmes, E., Kinross, J., et al. Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science*. 2012; 336:1262–1267.

Wamelink, M. M., Struys, E. A., Jakobs, C. The biochemistry, metabolism and inherited defects of the pentose phosphate pathway: a review. *J Inherit Metab Dis*. 2008; 31:703–717.

Weissman, J. S., Coyle, W. Stool transplants: ready for prime time? *Curr Gastroenterol Rep*. 2012; 14:313–316.

Sites

American Society of Hematology, case studies on anemia: http://teachingcases.hematology.org/

CAPÍTULO 13

Armazenamento e Síntese de Carboidratos no Fígado e no Músculo

John W. Baynes

Objetivos

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever a estrutura do glicogênio.
- Identificar os locais primários de armazenamento de glicogênio no corpo e a função do glicogênio nesses tecidos.
- Resumir as vias metabólicas para a síntese e a degradação do glicogênio.
- Descrever o mecanismo pelo qual o glicogênio é mobilizado do fígado em resposta ao glucagon, no músculo durante o exercício e em ambos os tecidos em resposta à epinefrina.
- Explicar a origem e as consequências das doenças de armazenamento do glicogênio no fígado e no músculo.
- Explicar o mecanismo de contrarregulação da glicogenólise e glicogênese no fígado.
- Resumir a via da gliconeogênese, incluindo substratos, enzimas únicas e mecanismos regulatórios.
- Descrever os papéis complementares da glicogenólise e gliconeogênese na manutenção da concentração sanguínea de glicose.

Introdução

A hemácia e o cérebro têm uma necessidade absoluta de glicose sanguínea para o metabolismo energético. Juntos, esses tecidos gastam cerca de 80% dos 200 g de glicose consumida no corpo por dia. Existem somente cerca de 10 g de glicose no plasma e no volume de fluido extracelular, de tal forma que a glicose sanguínea tem de ser reabastecida constantemente. Do contrário, a hipoglicemia se desenvolve e compromete

a função cerebral, levando à confusão e à desorientação e possivelmente ao coma com risco de vida em concentração de glicose sanguínea abaixo de 2,5 mmol/L (45 mg/dL). Absorvemos glicose a partir de nossos intestinos por somente 2-3 horas após uma refeição contendo carboidrato; assim, tem de existir um mecanismo para a manutenção da glicose sanguínea entre as refeições.

O glicogênio, uma forma de armazenamento de glicose como polissacarídio, é nossa primeira linha de defesa contra o declínio na concentração sanguínea de glicose. Durante e imediatamente após a refeição, a glicose é convertida em glicogênio, um processo conhecido como **glicogênese,** tanto no fígado quanto no músculo. A concentração tecidual de glicogênio é maior no fígado do que no músculo, mas em função da massa relativa de músculo e fígado a maioria do glicogênio no corpo é armazenada no músculo (Tabela 13.1).

Tabela 13.1

Distribuição tecidual das reservas de energia de carboidratos (adulto de 70 kg)

Tecido	Tipo	Quantidade	% da massa tecidual	Calorias
Fígado	Glicogênio	75 g	3-5%	300
Músculo	Glicogênio	250 g	0,5-1,0%	1.000
Sangue e fluido extracelular	Glicose	10 g	—	40

A glicogenólise e a gliconeogênese hepáticas são necessárias à manutenção da concentração normal de glicose sanguínea

O glicogênio hepático é gradualmente degradado entre as refeições, pela via da glicogenólise, liberando glicose para manter a concentração sanguínea de glicose. Entretanto, os estoques de glicogênio total hepático são suficientes apenas para a manutenção da concentração sanguínea de glicose durante 12 horas de jejum.

Durante o sono, quando não estamos comendo, existe uma mudança gradual da **glicogenólise** para a síntese *de novo* de glicose, também uma via hepática, conhecida como **gliconeogênese** (Fig. 13.1). A gliconeogênese é essencial à sobrevivência durante o jejum ou a inanição, quando as reservas de glicogênio são esgotadas. O fígado usa aminoácidos das proteínas musculares como precursores primários de glicose, mas também faz uso do lactato da glicólise e do glicerol do catabolismo de gorduras. Os ácidos graxos, mobilizados dos estoques de triglicerídios do tecido adiposo, fornecem energia para a gliconeogênese.

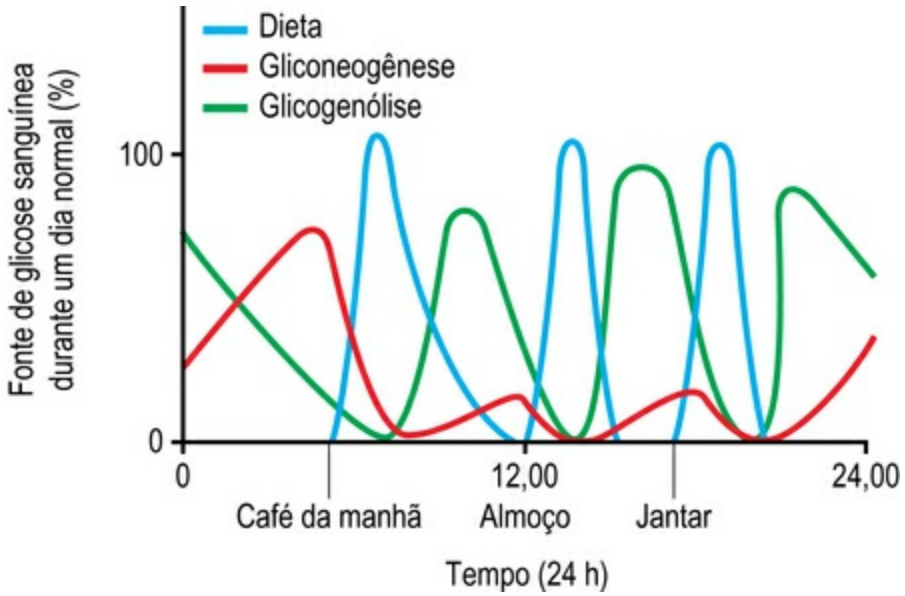


FIG. 13.1 Fontes de glicose sanguínea durante um dia normal. Entre as refeições, a glicose sanguínea é derivada primariamente do glicogênio hepático. Dependendo da frequência da alimentação, a glicogenólise e a gliconeogênese podem ser mais ou menos ativas durante o dia. Tarde da noite ou de manhã cedo, após a depleção de uma fração importante do glicogênio hepático, a gliconeogênese se torna a fonte primária de glicose sanguínea.

O glicogênio é armazenado no músculo para utilização no metabolismo energético

O glicogênio muscular não está disponível para a manutenção da glicose sanguínea. A glicose obtida do sangue e do glicogênio é usada exclusivamente para o metabolismo energético no músculo, especialmente durante a explosão de uma atividade física. Embora os músculos cardíaco e esquelético contem com as gorduras como suas fontes primárias de energia, algum metabolismo de glicose é essencial para o metabolismo eficiente da gordura nesses tecidos.

Este capítulo descreve as vias de glicogênese e glicogenólise no fígado e músculo e a via da gliconeogênese no fígado.

Estrutura do glicogênio

O glicogênio, um glicano altamente ramificado, é a forma de armazenamento da glicose nos tecidos

O glicogênio é um polissacarídio ramificado de glicose. Ele contém somente dois tipos de ligações glicosídicas, cadeias com resíduos de glicose unidos por ligações $\alpha 1 \rightarrow 4$ com ramificações $\alpha 1 \rightarrow 6$ espaçadas cerca de cada 4-6 resíduos em toda a extensão da cadeia $\alpha 1 \rightarrow 4$ (Fig. 13.2). O glicogênio está intimamente relacionado ao **amido,** o polissacarídio de armazenamento das plantas, mas o amido consiste em uma mistura de amilose e amilopectina. O componente amilose contém somente cadeias $\alpha 1 \rightarrow 4$ lineares; o componente amilopectina tem uma estrutura mais parecida com a do glicogênio, mas com menos ramificações $\alpha 1 \rightarrow 6$, cerca de uma para cada 12 resíduos de glicose unidos por ligações $\alpha 1 \rightarrow 4$. A estrutura total do glicogênio é dendrítica por natureza, expandindo-se a partir de uma sequência central ligada a um resíduo de tirosina na

proteína **glicogenina** e desenvolvendo-se para uma estrutura final semelhante a uma cabeça de couve-flor. As enzimas do metabolismo do glicogênio estão ligadas à superfície da partícula de glicogênio; muitas moléculas de glicose terminais na superfície da molécula fornecem fácil acesso para a rápida liberação de glicose a partir do polímero de glicogênio.

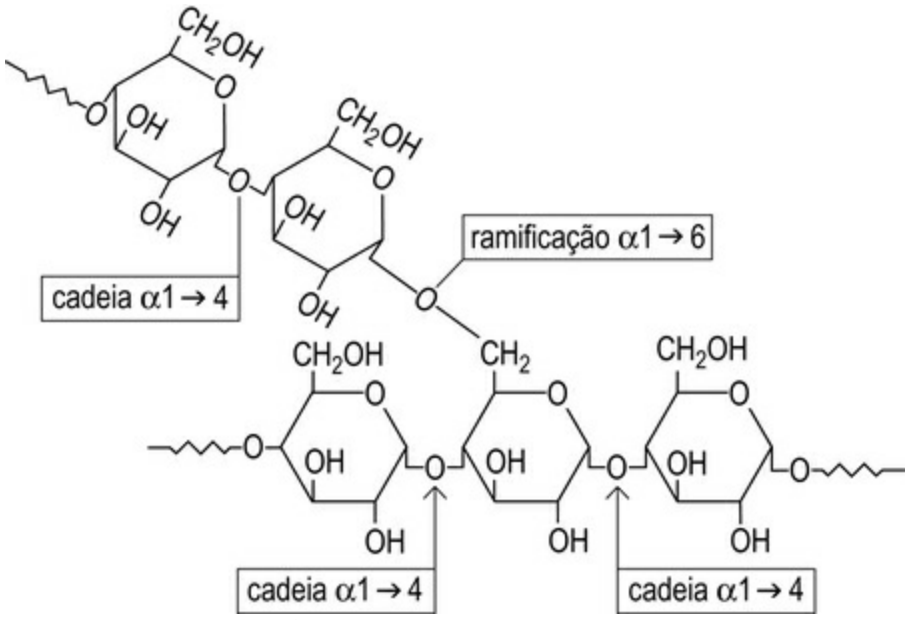


FIG. 13.2 Estrutura do glicogênio. A figura mostra as ligações α1 → 4 e o ponto de ramificação com a ligação α1 → 6. O glicogênio é armazenado como grânulos no citoplasma das células hepáticas e musculares.

Via de glicogênese a partir da glicose sanguínea no fígado

A glicogênese é ativada no fígado e no músculo após a refeição

O fígado é rico no transportador de glicose **GLUT-2** de alta capacidade e baixa afinidade (K_m >10 mmol/L), o que o torna livremente permeável à glicose liberada em altas concentrações no sangue portal durante e após a refeição (Tabela 8.2). O fígado também é rico em **glicocinase,** uma enzima que é específica para a glicose e a converte em glicose 6-fosfato (Glc-6-P). A glicocinase (GK) é induzível pelo consumo continuado de dieta rica em carboidrato. Ela tem alta K_m, cerca de 5-7 mmol/L, de modo que sua atividade aumenta à medida que a glicose portal aumenta acima do normal de 5 mmol/L (100 mg/dL) da concentração sanguínea de glicose. Ao contrário da hexocinase, a GK não é inibida pela Glc-6-P, de tal forma que a concentração de Glc-6-P aumenta rapidamente no fígado após uma refeição rica em carboidrato, forçando a entrada de glicose nas principais vias do metabolismo de glicose: glicólise, via das pentoses fosfato e glicogênese (Fig. 12.2). A glicose é canalizada para a síntese de glicogênio, fornecendo uma reserva de carboidrato para a manutenção da glicose sanguínea durante o estado pós-absortivo. A Glc-6-P em excesso no fígado, além de necessária para restabelecer as reservas de glicogênio, é então afunilada para a glicólise, em parte para a produção de

energia, mas primariamente para a conversão em ácidos graxos e triglicerídios, que são exportados para armazenamento no tecido adiposo. A glicose que passa através do fígado causa um aumento na concentração de glicose sanguínea periférica após refeições ricas em carboidratos. Essa glicose é usada no músculo para a síntese e o armazenamento de glicogênio e no tecido adiposo como fonte de glicerol para a biossíntese de triglicerídios.

A via da glicogênese a partir da glicose (Fig. 13.3A) envolve quatro etapas:

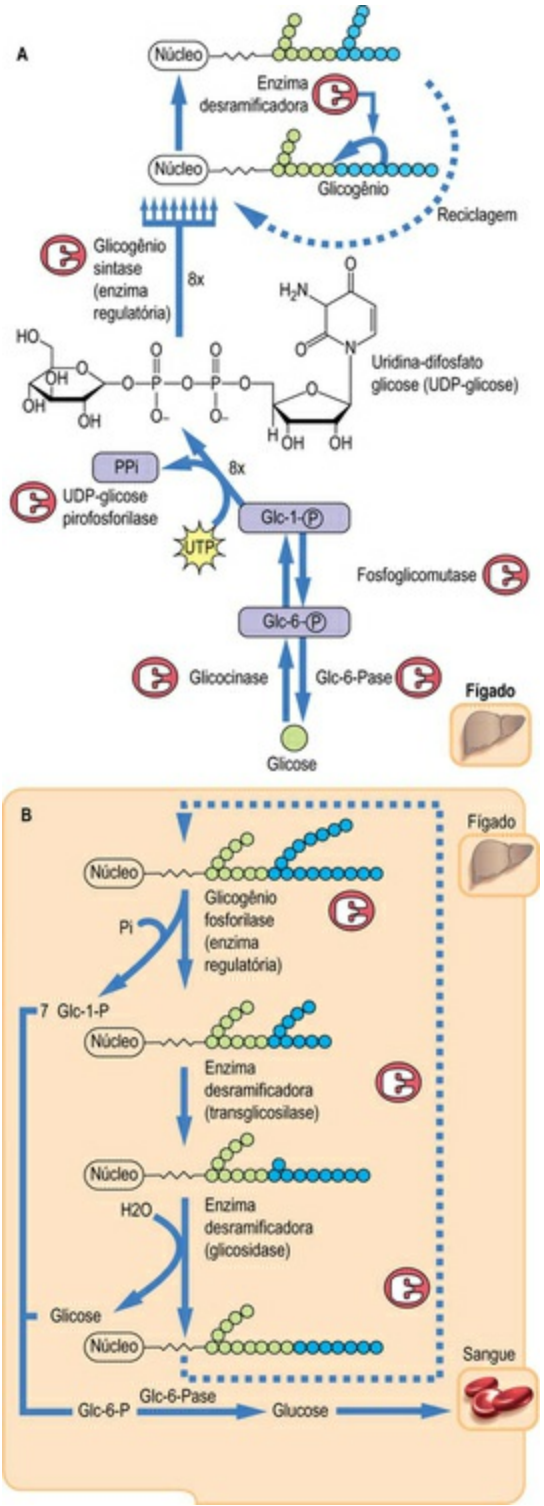


FIG. 13.3 Vias da glicogênese (A) e da glicogenólise (B).

- Conversão de Glc-6-P em glicose-1-fosfato (Glc-1-P) pela fosfoglicomutase.
- Ativação da Glc-1-P em uridina difosfato (UDP)-glicose pela enzima UDP-glicose

pirofosforilase.

- Transferência de glicose da UDP-Glc para o glicogênio com ligações $\alpha 1 \rightarrow 4$ pela glicogênio sintase, um membro da classe de enzimas conhecidas como glicosiltransferases.
- Quando a cadeia $\alpha 1 \rightarrow 4$ excede oito resíduos em comprimento, a enzima ramificadora do glicogênio, uma transglicosilase, transfere alguns dos açúcares com ligações $\alpha 1 \rightarrow 4$ para uma ramificação $\alpha 1 \rightarrow 6$, permitindo o alongamento contínuo de ambas as cadeias α1-4 até que elas, sucessivamente, se tornem longas o suficiente para a transferência pela enzima de ramificação.

A **glicogênio sintase** é a enzima regulatória da glicogênese, em vez da UDP-glicose fosforilase, porque a UDP-glicose também é usada para a síntese de outros açúcares e como um doador glicosil para a síntese de glicoproteínas, glicolipídios e proteoglicanos (Caps. 27-29). O pirofosfato (PPi), o outro produto da reação da pirofosforilase, é um fosfoanidrido de alta energia. É rapidamente hidrolisado a fosfato inorgânico pela pirofosfatase, fornecendo a força motriz termodinâmica para a biossíntese de glicogênio.

Via da glicogenólise no fígado

A glicogênio fosforilase hepática permite a rápida liberação de glicose para o sangue durante o estado pós-absortivo

Assim como a maioria das vias metabólicas, enzimas separadas, algumas vezes em compartimentos subcelulares separados, são necessárias para vias reversas. A via da glicogenólise (Fig. 13.3B) se inicia com a remoção dos abundantes resíduos de glicose externos unidos por ligações $\alpha 1 \rightarrow 4$ no glicogênio. Isso é consumado não por uma hidrolase, mas pela **glicogênio fosforilase,** uma enzima que usa o fosfato citosólico e libera glicose do glicogênio na forma de Glc-1-P. A Glc-1-P é isomerizada pela fosfoglicomutase a Glc-6-P, colocando-a no topo da via glicolítica; a reação de fosforilase, com efeito, desvia a necessidade por ATP nas reações da hexocinase e glicocinase. No fígado, a glicose é liberada da Glc-6-P pela glicose-6-fosfatase (Glc-6-Pase) e a glicose sai via transportador GLUT-2 para o sangue. O passo regulatório, limitante da velocidade na glicogenólise, é catalisado pela fosforilase, a primeira enzima na via.

A fosforilase é específica para ligações glicosídicas $\alpha 1 \rightarrow 4$; ela não pode quebrar ligações $\alpha 1 \rightarrow 6$. Além disso, essa grande enzima não pode alcançar eficientemente os resíduos de glicose das ramificações. Assim, como mostrado na Figura 13.3B, a fosforilase cliva os resíduos externos de glicose até que as ramificações tenham três ou quatro resíduos de extensão, então a **enzima desramificadora,** que tem as atividades de transglicosilase e de glicosidade, move um pequeno segmento de resíduos de glicose ligados às ramificações $\alpha 1 \rightarrow 6$ para a porção terminal de uma cadeia $\alpha 1 \rightarrow 4$ adjacente, deixando um único resíduo de glicose no ponto de ramificação. Essa glicose é então removida pela atividade exo-1,6-glicosidase desramificadora, permitindo que a glicogênio fosforilase proceda com a degradação da extensão da cadeia $\alpha 1 \rightarrow 4$ até que outro ponto de ramificação se aproxime, permitindo a repetição das reações da transglicosilase e

glicosidase. Cerca de 90% da glicose é liberada do glicogênio como Glc-1-P, e o remanescente, derivado dos resíduos da ramificação $\alpha 1 \rightarrow 6$, como glicose livre.



Quadro clínico

Doença de von gierke: doença do armazenamento do glicogênio causada pela deficiência de glicose-6-fosfatase

Um bebê estava cronicamente adoentado, irritável, com sudorese e letárgico, e demandava alimentação frequente. A avaliação física indicou abdome estendido, resultado de fígado aumentado. A glicose sanguínea, medida 1 hora após alimentação foi de 3,5 mmol/L (70 mg/dL); valor normal: cerca de 5 mmol/L (100 mg/dL). Após 4 horas, quando a criança exibia irritabilidade e sudorese, sua frequência cardíaca estava aumentada (pulso = 110) e a glicose sanguínea havia declinado para 2 mmol/L (40 mg/dL). Esses sintomas foram corrigidos pela alimentação. Uma biopsia hepática mostrou deposição maciça de partículas de glicogênio no citosol hepático.

Comentário

Essa criança não pode mobilizar glicogênio. Por causa da gravidade da hipoglicemia, a mutação mais provável é na Glc-6-Pase hepática, que é necessária para a produção de glicose pela glicogenólise e pela gliconeogênese. O tratamento envolve alimentação frequente com carboidratos de digestão lenta, como, por exemplo, amido não cozido e gotejamento de alimentação nasogástrica durante a noite.

Regulação hormonal da glicogenólise hepática

Três hormônios (insulina, glucagon e cortisol) contrarregulam a glicogenólise e a gliconeogênese

A glicogenólise é ativada no fígado em resposta a uma demanda de glicose sanguínea, por causa de sua utilização durante o estado pós-absortivo ou em preparação para a utilização aumentada de glicose em resposta a estresse. Existem três principais ativadores hormonais da glicogenólise: glucagon, epinefrina (adrenalina) e cortisol (Tabela 13.2).

Tabela 13.2

Hormônios envolvidos no controle da glicogenólise

Hormônio	Fonte	Iniciador	Efeito na glicogenólise
Glucagon	Células α pancreáticas	Hipoglicemia	Ativação rápida
Epinefrina	Medula adrenal	Estresse agudo, hipoglicemia	Ativação rápida
Cortisol	Córtex adrenal	Estresse crônico	Ativação crônica
Insulina	Células β-pancreáticas	Hiperglicemia	Inibição

O **glucagon** é um hormônio peptídio (3.500 Da), secretado pelas **células α** do pâncreas endócrino. Sua função primária é ativar a glicogenólise hepática para a manutenção da concentração sanguínea de glicose normal (normoglicemia). O glucagon tem uma pequena meia-vida no plasma, cerca de 5 min, como resultado da ligação ao receptor, filtração renal e inativação proteolítica no fígado. A concentração de glucagon no plasma, portanto, muda rapidamente em resposta às necessidades por glicose sanguínea. O glucagon sanguíneo aumenta entre as refeições, diminui durante uma refeição e está cronicamente aumentado durante o jejum ou em uma dieta pobre em carboidratos (Cap. 21).

A glicogenólise também é ativada em resposta a estresse agudo e crônico. O estresse pode ser:

- fisiológico: por exemplo, em resposta à utilização aumentada de glicose sanguínea durante o exercício;
- patológico: por exemplo, como resultado de perda de sangue (choque);
- psicológico: por exemplo, em resposta a ameaças agudas ou crônicas.



Quadro clínico: doença de mcardle

Uma doença de armazenamento do glicogênio que reduz a capacidade para o exercício

Um homem de 30 anos consultou seu médico por causa de dores musculares crônicas nos braços e pernas e câimbras durante o exercício. Ele indicou que sempre teve alguma fraqueza muscular e, por essa razão, nunca fora ativo em esportes escolares, mas o problema não se tornou sério até que recentemente se matriculou em um programa de exercícios para melhorar sua saúde. Ele também notou que a dor geralmente desaparecia após cerca de 15-30 minutos, quando então podia continuar com seu exercício sem desconforto. Sua concentração de glicose sanguínea estava normal durante o exercício, mas a creatina cinase sérica (isoforma MM para o músculo esquelético) estava elevada, sugerindo dano muscular. A glicose no sangue diminuiu ligeiramente durante 15 minutos de exercício, mas inesperadamente o lactato sanguíneo também diminuiu, em vez de aumentar, mesmo quando estava sentindo câimbras musculares. Uma biopsia indicou um nível anormalmente alto de glicogênio

no músculo, sugerindo doença de armazenamento de glicogênio.

Comentário

Esse paciente sofre da doença de McArdle, uma rara deficiência na atividade da fosforilase muscular. A deficiência real na enzima tem de ser confirmada por ensaio enzimático, já que várias outras mutações também poderiam afetar o metabolismo do glicogênio muscular. Durante os períodos iniciais de exercício intenso, o músculo obtém a maior parte de sua energia através do metabolismo da glicose, derivada do glicogênio. Durante as câimbras, que normalmente ocorrem durante débito de oxigênio, a maioria do piruvato produzido pela glicólise é excretada no sangue como lactato, levando a aumento na concentração de lactato no sangue. Nesse caso, entretanto, o paciente teve câimbras mas não excretou lactato, sugerindo uma falha em mobilizar o glicogênio muscular para produzir a glicose. Sua recuperação após 15-30 minutos resulta de ativação mediada por epinefrina da glicogenólise hepática, que fornece glicose ao sangue para aliviar o déficit na glicogenólise muscular. O tratamento da doença de McArdle usualmente envolve evitar o exercício ou o consumo de carboidratos antes do exercício. Do contrário, o curso da doença será inevitável.

O estresse agudo, independentemente de sua origem, causa uma ativação da glicogenólise através da ação do **hormônio catecolamínico epinefrina,** liberado pela medula adrenal. Durante o exercício prolongado, o glucagon e a epinefrina contribuem para a estimulação da glicogenólise e para a manutenção da concentração sanguínea de glicose.

Concentrações sanguíneas aumentadas do hormônio esteroide adrenocortical cortisol também induzem a glicogenólise. Os níveis do **glicocorticoide cortisol** variam diurnamente no plasma, mas podem estar cronicamente elevados sob condições continuamente estressantes, incluindo estresse fisiológico e ambiental (p. ex., o frio).

O glucagon serve como um modelo geral para o mecanismo de ação dos hormônios que agem pela via de receptores na superfície celular. O cortisol, que age no nível de expressão gênica, será discutido mais adiante, nos Capítulos 35 e 39.

Mecanismo de ação do glucagon

O glucagon ativa a glicogenólise durante o estado pós-absortivo

O glucagon se liga a um receptor na membrana plasmática hepática e inicia uma cascata de reações que levam à mobilização do glicogênio hepático (Fig. 13.4) durante o estado pós-absortivo. No lado interno da membrana plasmática existe uma classe de proteínas transdutoras de sinal, conhecidas como **proteínas G,** que se ligam ao trifosfato de guanosina (GTP) e ao difosfato de guanosina (GDP), nucleotídios análogos ao ATP e ao ADP. O GDP está ligado no estado de repouso. A ligação do glucagon ao receptor da membrana plasmática estimula a troca de GDP por GTP na proteína G, e a proteína G passa por mudança conformacional que leva à dissociação de uma de sua subunidade α, que então se liga e ativa a enzima da membrana plasmática **adenilato ciclase.** Essa

enzima converte ATP citoplasmático em **AMP 3′,5′-cíclico (cAMP),** um mediador solúvel que é descrito como **"segundo mensageiro"** para a ação do glucagon (e outros hormônios). O cAMP se liga à enzima citoplasmática **proteína cinase A (PKA),** causando a dissociação das subunidades inibitórias (regulatórias) das subunidades catalíticas da enzima heterodimérica, diminuindo a inibição da PKA (Caps. 21 e 40), que então fosforila os resíduos de serina e treonina nas proteínas e enzimas-alvo.

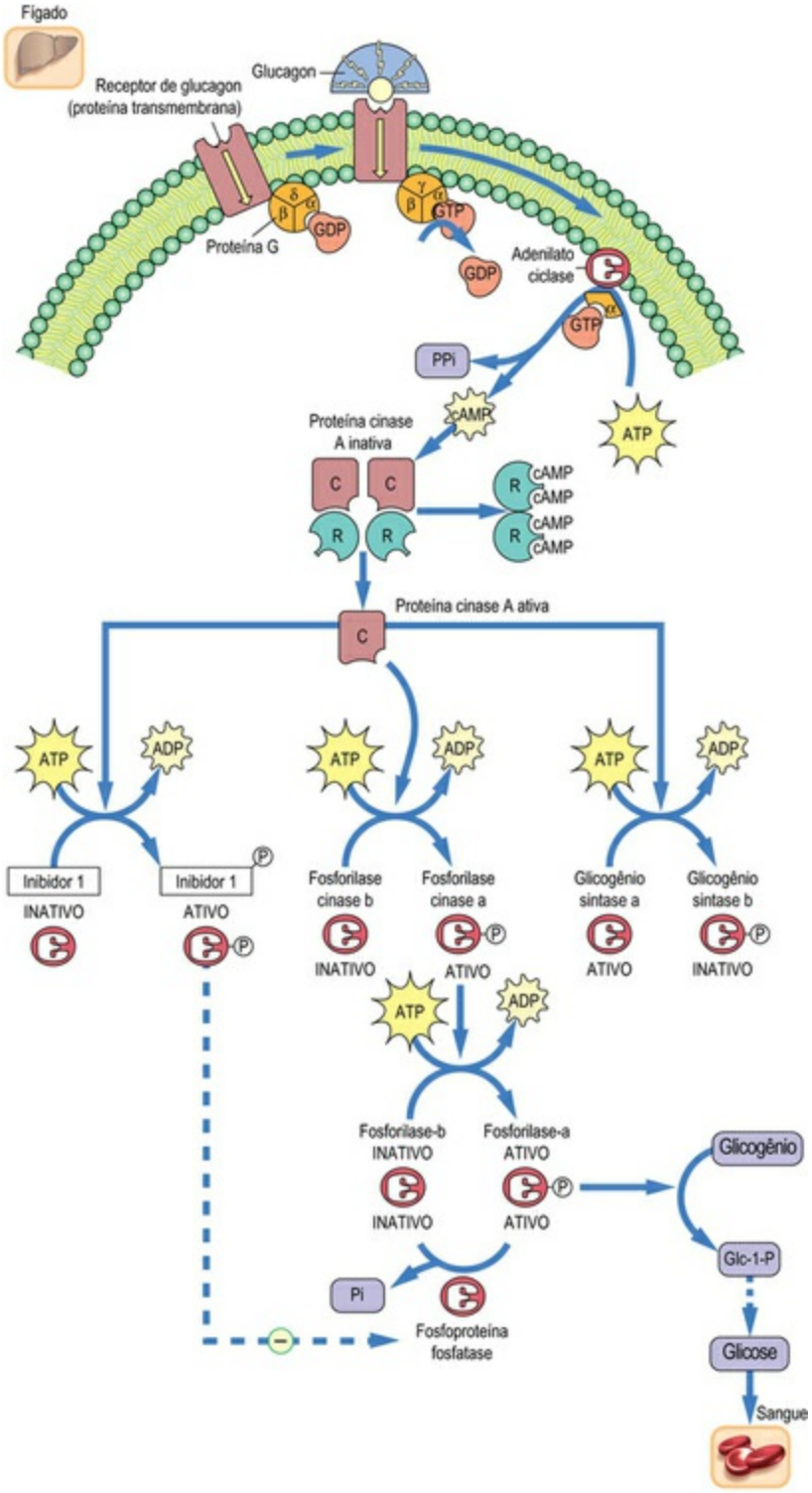


FIG. 13.4 Sistema de amplificação em cascata.
Mobilização de glicogênio hepático pelo glucagon. A cascata de reações amplifica a resposta hepática à ligação do glucagon ao seu receptor na membrana plasmática. O cAMP é conhecido como o segundo mensageiro da ação do glucagon. A PKA ativa indiretamente a fosforilase via fosforilase cinase e inativa diretamente a glicogênio sintase. C, subunidades catalíticas; R, subunidades regulatórias (inibitórias); PKA, proteína cinase A.

A via para a ativação da glicogênio fosforilase (Fig. 13.4) envolve a fosforilação de muitas moléculas de fosforilase cinase pela PKA, que então fosforila e ativa muitas moléculas de glicogênio fosforilase. O efeito global dessas etapas sequenciais, começando com a ativação de muitas moléculas de adenilato ciclase pelas proteínas G, é um sistema de **"amplificação em cascata",** não diferente de uma série de amplificadores em um rádio ou em um aparelho de som, resultando em aumento maciço na extensão do

sinal dentro de segundos após a ligação do glucagon à membrana plasmática do hepatócito. A fosforilação da fosforilase ativa a glicogenólise, levando à produção de Glc-6-P no fígado, que é então hidrolisada a glicose e exportada para o sangue. Outro alvo da PKA é o **inibidor 1,** uma fosfoproteína inibidora da proteína fosfatase, que é ativado pela fosforilação. O inibidor 1 fosforilado inibe as fosfoproteínas fosfatases citoplasmáticas, que poderiam, de outro modo, reverter a fosforilação das enzimas e reprimir a resposta ao glucagon (Fig. 13.4).



Quadro de conceitos avançados

Proteínas G

As proteínas G são proteínas da membrana plasmática, ligantes de nucleotídio de guanosina que estão envolvidas na transdução de sinal para uma grande variedade de hormônios (Fig. 13.4; Cap. 39). Em alguns casos elas estimulam (Gs) e em outros casos elas inibem (Gi) as proteínas cinase e a fosforilação de proteínas. As proteínas G estão intimamente associadas a receptores de hormônios nas membranas plasmáticas, e consistem em subunidades α, β e γ. A subunidade G_α liga GDP no estado de repouso. Após a ligação do hormônio, o receptor recruta as proteínas G, estimulando a troca de GDP por GTP na subunidade G_α. A ligação do GTP leva à liberação das subunidades β e γ e a subunidade α está então livre para se ligar e ativar a adenilato ciclase. A resposta hormonal é amplificada após a ligação ao receptor porque um único receptor pode ativar várias subunidades α. As respostas hormonais também são desligadas no nível dos receptores e proteínas G por dois mecanismos:

- A subunidade G_α tem atividade lenta de trifosfato de guanosina fosfatase que hidrolisa GTP, com uma meia-vida medida em minutos, de modo que gradualmente se dissocia da adenilato ciclase e, assim, para de ativá-la.
- A fosforilação do receptor de hormônio pela proteína cinase A reduz sua afinidade pelo hormônio, um processo descrito como dessensibilização ou resistência ao hormônio.



Quadro de conceitos avançados

A proteína cinase a é muito sensível a pequenas mudanças na concentração de camp

Como ilustrado na Figura 13.4, a PKA dependente de cAMP é uma enzima tetramérica com dois tipos diferentes de subunidades (R_2C_2); a subunidade catalítica C tem atividade de proteína cinase e a subunidade regulatória R inibe essa atividade. A subunidade R tem uma sequência de aminoácidos que poderia normalmente ser reconhecida e fosforilada pela subunidade C, exceto pelo fato de que essa sequência em R contém uma alanina, em vez de um resíduo de serina ou treonina. A ligação de

duas moléculas de cAMP a cada subunidade R resulta em mudanças conformacionais que levam à dissociação de um dímero ($cAMP_2$-R_2) das subunidades C. As subunidades C monoméricas ativas então começam a fosforilar os resíduos de serina e treonina nas enzimas-alvo. A PKA não é uma enzima alostérica típica, em que a ligação de um efetor alostérico (cAMP) causa dissociação das subunidades; entretanto, a ativação completa da PKA envolve a ligação cooperativa de quatro moléculas de cAMP a duas subunidades R. A PKA é totalmente ativada em concentrações submicromolares de cAMP, de modo que ela é refinadamente sensível a pequenas mudanças na atividade da adenilato ciclase em resposta ao glucagon.

A glicogenólise e a gliconeogênese são contrarreguladas pela proteína cinase A, que ativa a fosforilase e inibe a glicogênio sintase

A glicogenólise e a glicogênese são vias opostas. Teoricamente, a Glc-1-P produzida pela fosforilase poderia ser rapidamente ativada à UDP-glicose e reincorporada ao glicogênio. Para prevenir esse desperdício ou **ciclo fútil,** a PKA também age diretamente na glicogênio sintase, nesse caso inativando a enzima. Então, a ativação da fosforilase (glicogenólise) é coordenada com a inativação da glicogênio sintase (glicogênese). Outras vias biossintéticas hepáticas, incluindo síntese de proteínas, colesterol, ácidos graxos e triglicerídios, assim como a glicólise, também são reguladas pela fosforilação de enzimas regulatórias chave, geralmente limitando reações biossintéticas e focando o metabolismo hepático em resposta ao glucagon na provisão de glicose para o sangue para a manutenção das funções corporais vitais (Cap. 21).

Talvez para equilibrar o balanço da cascata de eventos que amplificam a resposta ao glucagon existam mecanismos múltiplos e redundantes para garantir a rápida terminação da resposta hormonal (Tabela 13.3). Em adição à lenta atividade de **GTPase** da subunidade G_α, também existe uma **fosfodiesterase** na célula que hidrolisa cAMP a AMP, permitindo a reassociação das subunidades inibitória e catalítica da PKA, reduzindo sua atividade de proteína cinase. Também existem **fosfoproteínas fosfatases** que removem os grupos fosfatos das formas ativas e fosforiladas da fosforilase cinase e da fosforilase. A redução na concentração de cAMP e na atividade PKA também leva à redução na fosforilação do inibidor 1, permitindo atividade aumentada das fosfoproteínas fosfatases. Assim, uma série de mecanismos age em conjunto para garantir que a glicogenólise hepática diminua rapidamente em resposta ao aumento na glicose sanguínea e à diminuição das concentrações sanguíneas de glucagon após a refeição.

Tabela 13.3

Vários mecanismos estão envolvidos na terminação da resposta hormonal ao glucagon

Hidrólise de GTP na subunidade G_{α}
Hidrólise do cAMP pela fosfodiesterase
Atividade da proteína fosfatase

Existem várias doenças genéticas autossômicas recessivas afetando o metabolismo do glicogênio (Tabela 13.4). Essas doenças, conhecidas como **doenças do armazenamento do glicogênio,** são caracterizadas pelo acúmulo de grânulos de glicogênio nos tecidos, que eventualmente comprometem suas funções. Prognosticamente, as doenças de armazenamento do glicogênio que afetam o metabolismo hepático do glicogênio são caracterizadas por hipoglicemia no jejum e podem ser fatais, enquanto os defeitos no metabolismo do glicogênio nos músculos são caracterizados por fadiga muscular rápida durante o exercício.

Tabela 13.4

Principais classes de doenças de armazenamento de glicogênio

Tipo	Nome	Deficiência enzimática	Consequências estruturais ou clínicas
I	Von Gierke	Glc-6-Pase	Hipoglicemia pós--absortiva grave, acidemia lática, hiperlipidemia
II	Pompe	α-glicosidade lisossomal	Grânulos de glicogênio nos lisossomos
III	Cori	Enzima desramificadora	Estrutura alterada do glicogênio, hipoglicemia
IV	Andersen	Enzima ramificadora	Estrutura do glicogênio alterada
V	McArdle	Fosforilase muscular	Deposição excessiva de glicogênio no músculo, câimbras e fadiga induzidas pelo exercício
VI	Hers	Fosforilase hepática	Hipoglicemia, não tão grave como no tipo I

Mobilização do glicogênio hepático pela epinefrina

A epinefrina ativa a glicogenólise durante o estresse aumentando a concentração sanguínea de glicose

A epinefrina trabalha através de vários receptores diferentes em diferentes células. Os receptores mais bem estudados são os receptores α e β-adrenérgicos; eles reconhecem diferentes características da molécula de epinefrina, ligam-se à epinefrina com diferentes afinidades, trabalham por diferentes mecanismos e são inibidos por diferentes classes de fármacos. Durante a hipoglicemia grave, o glucagon e a epinefrina trabalham juntos para ampliar a resposta glicogenolítica no fígado. Entretanto, mesmo quando a glicose sanguínea está normal, a epinefrina é liberada em resposta às ameaças reais ou

percebidas, causando aumento na glicose sanguínea para garantir a resposta de "luta ou fuga". A **cafeína** do café e a **teofilina** do chá são inibidores da fosfodiesterase e também causam aumento no cAMP hepático e na glicose sanguínea. Assim como a epinefrina, a cafeína, administrada na forma de poucas xícaras de café forte, também pode nos tornar alertas, responsivos e agressivos.

A ação da epinefrina sobre a glicogenólise hepática procede por duas vias. Uma delas, através do **receptor β-adrenérgico** da epinefrina, é similar àquela do glucagon, envolvendo um receptor específico para epinefrina na membrana plasmática, proteínas G e cAMP. A resposta à epinefrina aumenta os efeitos do glucagon durante a hipoglicemia grave (estresse metabólico) e também explica, em parte, a taquicardia, o suor, os tremores e a ansiedade associados à hipoglicemia. A epinefrina também trabalha simultaneamente através do receptor α, mas por um mecanismo diferente. A ligação aos receptores α também envolve proteínas G, elementos comuns na transdução do sinal de hormônios, mas, nesse caso, a proteína G é específica para a ativação de uma isoenzima específica de membrana da **fosfolipase C (PLC),** que é específica para a quebra de um fosfolipídio de membrana, o **fosfatidilinositol bifosfato (PIP_2)** (Fig. 13.5). Ambos os produtos da ação da PLC, **diacilglicerol (DAG)** e **inositol trifosfato (IP_3),** agem como segundos mensageiros da ação da epinefrina. O DAG ativa a **proteína cinase C (PKC)** que, assim como a PKA, inicia a fosforilação dos resíduos de serina e de treonina nas proteínas-alvo. O IP_3 promove o transporte de Ca^{2+} para o citosol. O Ca^{2+} então se liga à proteína citoplasmática calmodulina, que se liga e ativa a fosforilase cinase, levando à fosforilação independente de cAMP e ativação da fosforilase. A proteína cinase dependente de Ca^{2+}-calmodulina e outras enzimas também são ativadas, pela fosforilação ou pela associação com o **complexo Ca^{2+}-calmodulina** (Fig. 13.5). Portanto, uma série de vias metabólicas é ativada em resposta ao estresse, especialmente aquelas envolvidas na mobilização das reservas energéticas.

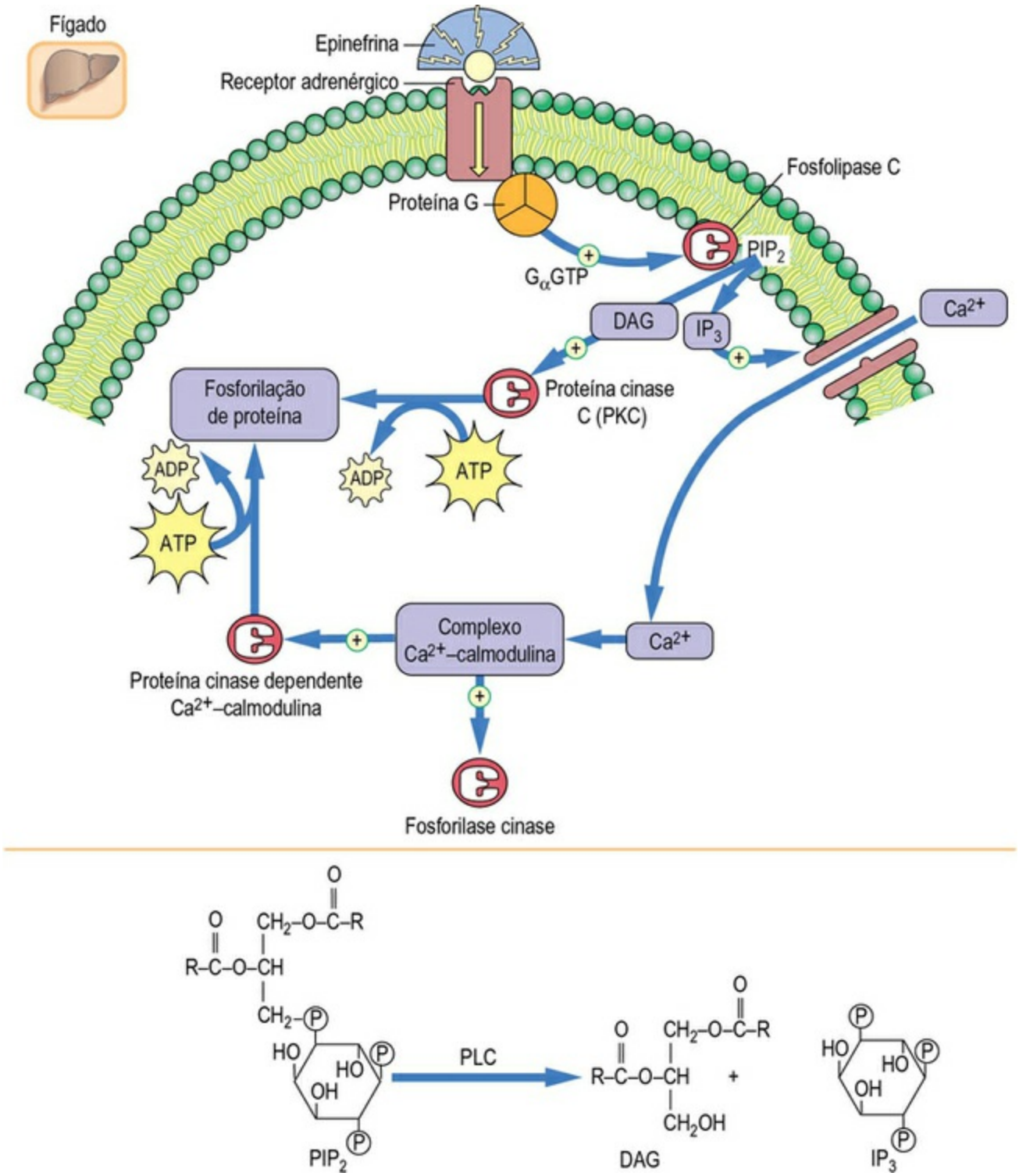


FIG. 13.5 Mecanismo de ativação da glicogenólise no fígado via receptor α-adrenérgico. O diacilglicerol (DAG) e o inositol trifosfato (IP_3) são segundos mensageiros que medeiam a resposta α-adrenérgica. PIP_2, fosfatidilinositol bifosfato; PKC, proteína cinase C. Ver também o Capítulo 40.

Glicogenólise no músculo

O músculo é desprovido de um receptor de glucagon e de glicose-6-fosfatase, e retém a glicose para o metabolismo energético mesmo durante a hipoglicemia

A localização tecidual dos receptores hormonais fornece especificidade tecidual para a ação dos hormônios. Assim, somente aqueles tecidos com receptores para glucagon

respondem a esse hormônio. O músculo pode ser rico em glicogênio, mesmo durante a hipoglicemia, mas não tem os receptores de glucagon nem Glc-6-Pase. Por esse motivo, o glicogênio muscular não pode ser mobilizado para reabastecer a glicose sanguínea. A glicogenólise muscular é ativada em resposta à epinefrina através do **receptor β-adrenérgico** cAMP-dependente, mas a glicose é metabolizada através da glicólise para a produção de energia. Isso ocorre não somente durante as situações de luta ou fuga, mas também em resposta às demandas metabólicas durante o exercício prolongado. Existem dois importantes mecanismos independentes de hormônio para a ativação da glicogenólise no músculo (Fig. 13.6). Primeiro, o influxo de Ca^{2+} para o citoplasma do músculo em resposta à estimulação do nervo ativa a forma basal não fosforilada da fosforilase cinase pela ação do complexo Ca^{2+}-calmodulina. Essa ativação independente de hormônio da fosforilase proporciona a rápida ativação da glicogenólise durante explosões curtas de exercício, mesmo na ausência da ação da epinefrina. O segundo mecanismo para a ativação da glicogenólise muscular envolve a ativação alostérica direta da fosforilase pelo AMP. O uso aumentado do ATP durante uma rápida explosão de atividade muscular leva ao rápido acúmulo de ADP, que é convertido em parte a AMP pela ação da enzima **miocinase (adenilato cinase),** que catalisa a reação:

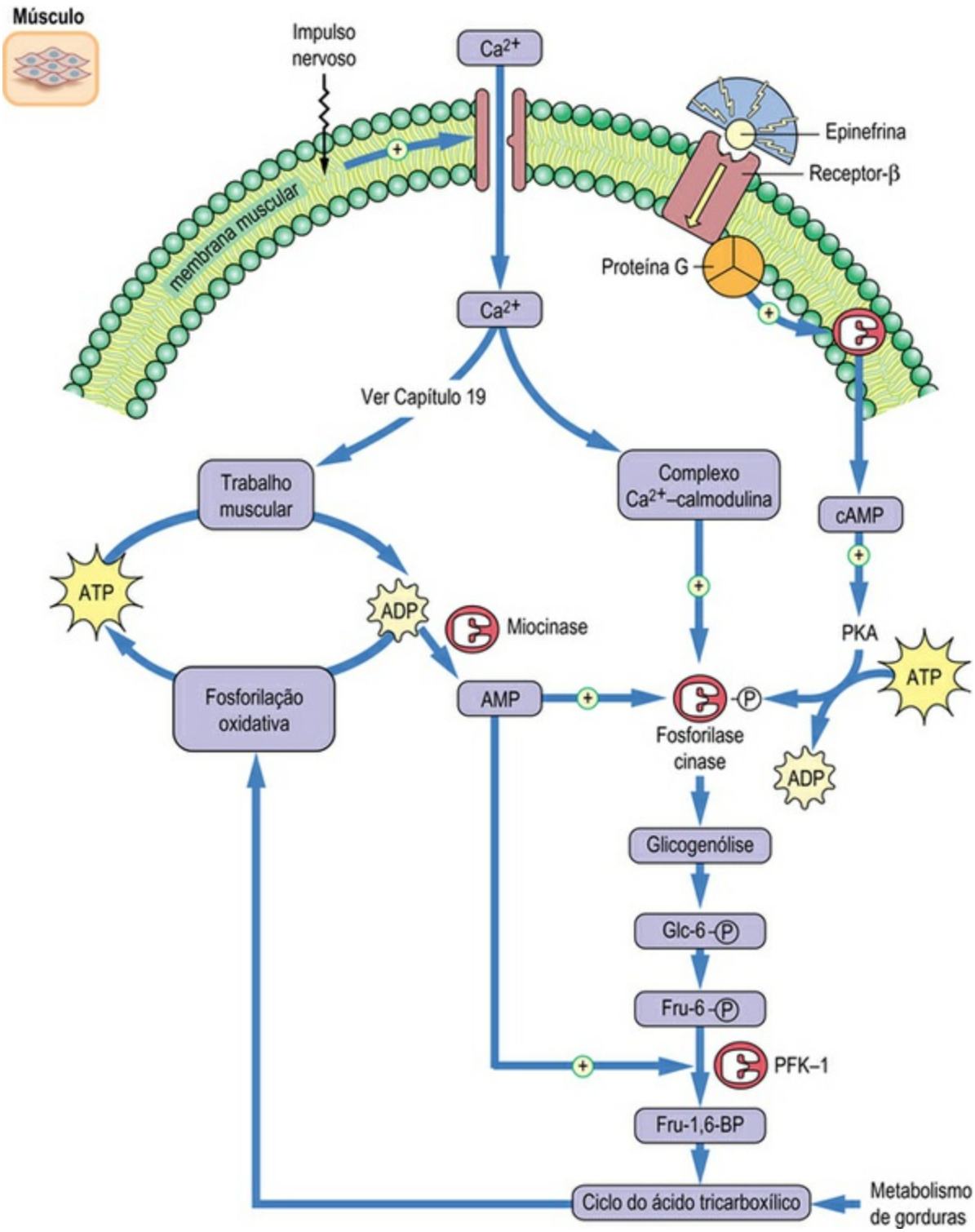


FIG. 13.6 Regulação da proteína cinase A (PKA) no músculo.
Ativação da glicogenólise e da glicólise no músculo durante o exercício. PFK-1, fosfofrutocinase-1. Compare com a Figura 8.4.

$$2\,\mathrm{ADP} \rightleftarrows \mathrm{ATP} + \mathrm{AMP}$$

Quadro de conceitos avançados

A Inibição máxima da glicogênio sintase é alcançada somente através de ação sequencial de várias cinases

Quando o glucagon e a epinefrina estão agindo no fígado, a ativação da glicogenólise e a inibição da glicogênese são mediadas por pelo menos três cinases: a proteína cinase A (PKA), a proteína cinase C (PKC) e a proteína cinase ativada por Ca^{2+}-calmodulina. Todas essas três proteínas cinases fosforilam resíduos-chave de serina e treonina nas enzimas regulatórias. Essas e outras proteínas cinases trabalham juntas umas com as outras em um processo conhecido como fosforilação sequencial ou hierárquica, levando à fosforilação de até nove resíduos de aminoácidos na glicogênio sintase. A inibição máxima da glicogênio sintase é alcançada somente através da atividade sequencial de várias cinases. Em alguns casos, certos resíduos de serina ou treonina têm de ser fosforilados em uma sequência específica pela ação cooperativa de diferentes cinases; como, por exemplo, a fosforilação de um sítio por uma enzima requer a fosforilação anterior de outro sítio por uma outra enzima.

O AMP ativa as formas basal e fosforilada da fosforilase, aumentando a glicogenólise na presença ou na ausência de estimulação hormonal. O AMP também atenua a inibição da fosfofrutocinase-1 (PFK-1) pelo ATP (Cap. 12), estimulando a utilização de glicose através da glicólise para a produção de energia. Os efeitos estimulatórios do Ca^{2+} e do AMP garantem que o músculo possa responder às suas necessidades energéticas, mesmo na ausência de estímulo hormonal.

Regulação da glicogênese

A insulina reverte a ação do glucagon e estimula a gliconeogênese

A glicogênese (e o armazenamento de energia em geral) ocorre durante e imediatamente após as refeições. A glicose e outros carboidratos que chegam ao fígado a partir do intestino via circulação porta são eficientemente capturados para a síntese de glicogênio. O excesso de glicose continua na circulação periférica, de onde a glicose é absorvida para o músculo e tecido adiposo para as reservas de energia ou armazenamento. Normalmente comemos sentados, em vez de durante o exercício, de modo que vias opostas de captação e armazenamento *versus* as de mobilização e utilização de abastecimento energético são funções temporariamente compartimentalizadas em nossa vida.

O armazenamento de energia está sob controle do **hormônio polipeptídico insulina,** que é produzido nas **células β** das ilhotas pancreáticas de Langerhans (Cap. 21). A insulina é secretada no sangue após a refeição, monitorando a concentração sanguínea de glicose. Ela tem duas funções primárias no metabolismo dos carboidratos: primeiro, reverte as ações do glucagon na fosforilação de proteínas, desligando a glicogênio fosforilase e ativando a glicogênio sintase, promovendo o armazenamento de glicose; segundo, estimula a captação de glicose pelos tecidos periféricos (músculo e tecido adiposo), facilitando a síntese e o armazenamento de glicogênio e triglicerídios. A

insulina também age no nível da expressão gênica, estimulando a síntese de enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos e no armazenamento e conversão de glicose em triglicerídios. Também atua como hormônio de crescimento, estimulando o *turnover* proteico, tanto a síntese quanto a degradação.

A **fosforilação em tirosinas de proteínas,** em vez da fosforilação em serinas e treoninas, é um aspecto característico da insulina e da atividade do fator de crescimento. A ligação da insulina ao seu receptor transmembrana (Fig. 13.7) estimula a agregação dos receptores e promove a atividade de **tirosina cinase** no domínio intracelular do receptor. O receptor de insulina **autofosforila** seus resíduos de tirosina, aumentando sua atividade da proteína tirosina cinase e fosforila os resíduos de tirosina em outras proteínas intracelulares efetoras, que então ativam vias secundárias. Dentre elas estão cinases que fosforilam resíduos de serina e treonina nas proteínas, mas em sítios e em proteínas diferentes daqueles fosforilados pela PKA e pela PKC. A ativação dependente de insulina da GTPase, da fosfodiesterase e das fosfoproteínas fosfatases também detém a ação do glucagon, que está tipicamente presente em altas concentrações no sangue nas horas das refeições, isto é, várias horas desde a última refeição.

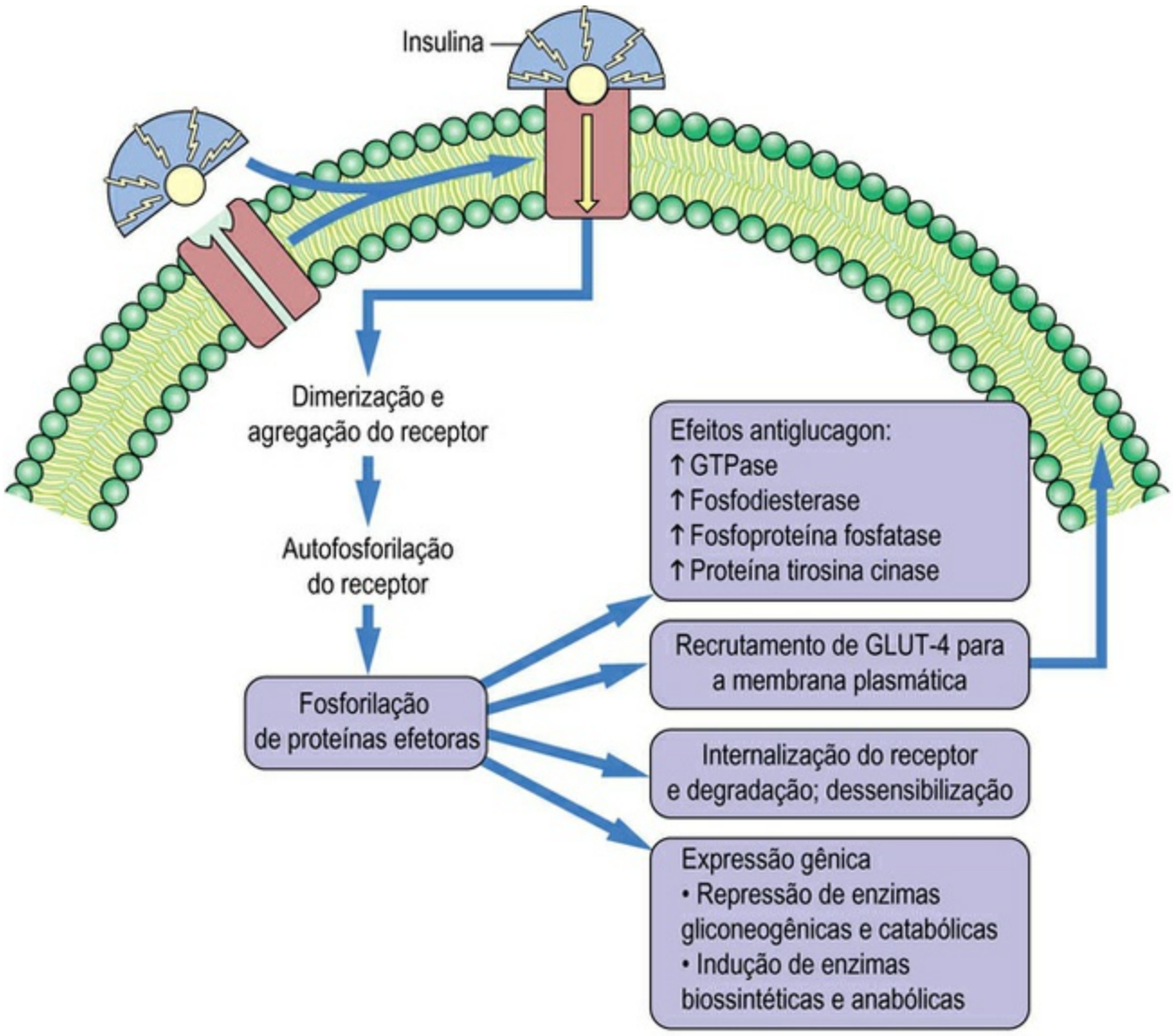


FIG. 13.7 Mecanismos de ação da insulina.
Efeitos regulatórios da insulina no metabolismo hepático e muscular de carboidratos (Cap. 21).

O fígado também parece ser diretamente responsivo à concentração sanguínea de glicose ambiente, uma vez que a síntese de glicogênio hepático aumenta após a refeição, mesmo na ausência de estímulo hormonal. Assim, o aumento na glicogênese hepática se inicia mais rapidamente do que o aumento na concentração de insulina no sangue. A perfusão do fígado com soluções de glicose *in vitro*, na ausência de insulina, também leva à inibição da glicogenólise e à ativação da glicogênese. Isso parece ocorrer pela inibição alostérica direta da fosforilase pela glicose e estimulação secundária da atividade de proteína fosfatase.

A maioria, se não todas, as células no corpo são responsivas à insulina de alguma maneira, mas os principais locais de ação da insulina, levando-se em conta a massa, são o músculo e o tecido adiposo. Esses tecidos normalmente têm baixos níveis de transportadores de glicose na superfície celular, restringindo a entrada de glicose — eles contam principalmente com os lipídios para o metabolismo energético. No músculo e no tecido adiposo, a atividade de tirosina cinase do receptor da insulina induz o movimento do transportador 4 de glicose (**GLUT-4;** Tabela 8.2) a partir dos vacúolos intracelulares para a superfície celular, aumentando o transporte de glicose para dentro da célula. A glicose é então usada no músculo para a síntese de glicogênio e no tecido adiposo para

produzir gliceraldeído-3-fosfato, que é convertido a glicerol-3-fosfato para a síntese de triglicerídios (Cap. 16). A absorção de glicose pelo músculo e pelo tecido adiposo mediada por GLUT-4 e estimulada pela insulina é o mecanismo primário que limita o aumento da glicose sanguínea após a refeição.

Gliconeogênese

A gliconeogênese é necessária à manutenção da glicose sanguínea durante o jejum e a inanição

Durante o jejum e a inanição, quando o glicogênio hepático é esgotado, a gliconeogênese é essencial para a manutenção da homeostasia da glicose sanguínea. Diferentemente da glicogenólise, que pode ser rapidamente ativada em resposta à estimulação hormonal, a gliconeogênese aumenta mais lentamente, dependendo das mudanças na expressão de genes, e alcança atividade máxima após um período de horas (Fig. 13.1); ela se torna a fonte primária de nossa concentração sanguínea de glicose cerca de oito horas no estado pós-absortivo (Cap. 21). A gliconeogênese necessita de uma fonte de energia para a biossíntese e uma fonte de carbono para a formação do esqueleto da molécula de glicose. Essa energia é fornecida pelo metabolismo de ácidos graxos liberados do tecido adiposo. Os esqueletos de carbono são fornecidos por três fontes primárias:

- Lactato produzido em tecidos como as hemácias e o músculo.
- Aminoácidos derivados de proteínas musculares.
- Glicerol liberado de triglicerídios durante a lipólise no tecido adiposo.



Quadro clínico

Criança grande nascida de mãe diabética

Um menino, nascido de mãe diabética, cronicamente hiperglicêmica e fracamente controlada, era grande e gordo (macrossômico) ao nascimento (5 kg), mas parecia normal. Ele enfraqueceu rapidamente, entretanto, e em 1 hora mostrou todos os sintomas de hipoglicemia, similar ao caso do bebê nascido de mãe malnutrida. A diferença, nesse caso, era que o menino estava obviamente pesado, em vez de pequeno e malnutrido.

Comentário

Essa criança experimentou um ambiente cronicamente hiperglicêmico durante o desenvolvimento uterino. Ela se adaptou através do aumento da produção de insulina endógena, que apresenta uma atividade semelhante ao hormônio do crescimento, resultando em macrossomia. Ao nascimento, quando o aporte placentário de glicose cessou, apresentava concentração normal de glicose sanguínea e substancial provisão de glicogênio hepático. Entretanto, a hiperinsulinemia crônica anterior ao nascimento provavelmente reprimiu as enzimas gliconeogênicas, e sua alta concentração

sanguínea de insulina ao nascimento promoveu uma captação de glicose pelos músculos e pelo tecido adiposo. Na ausência de fonte materna de glicose, a hipoglicemia induzida pela insulina levou a uma resposta de estresse, que foi corrigida pela infusão de glicose. Após 1-2 dias, sua ampla massa corporal irá fornecer um bom reservatório para a síntese de glicose sanguínea a partir de proteína muscular.

Dentre estas, **a proteína muscular é o principal precursor da glicose sanguínea durante o jejum e a inanição** — a velocidade da gliconeogênese frequentemente é limitada pela disponibilidade de substrato, incluindo a velocidade de proteólise no músculo ou, em alguns casos, da massa muscular. Durante o jejum prolongado, a má nutrição ou a inanição, perdemos massa adiposa e muscular. A gordura é usada tanto para as necessidades energéticas gerais do corpo quanto para o sustento da gliconeogênese, enquanto a maioria dos aminoácidos nas proteínas é convertida em glicose; a excreção de nitrogênio na urina (ureia) também é aumentada.

Gliconeogênese a partir do lactato

A gliconeogênese usa lactato, aminoácidos e glicerol como substratos para a síntese de glicose; os ácidos graxos fornecem a energia

A gliconeogênese a partir do lactato é conceitualmente o oposto da glicólise anaeróbica, mas segue por uma via ligeiramente diferente, envolvendo enzimas mitocondriais e citosólicas (Fig. 13.8). Durante a gliconeogênese hepática, o lactato é convertido em glicose, usando, em parte, as mesmas enzimas glicolíticas envolvidas na conversão de glicose em lactato. O ciclo do lactato, que envolve o fígado, as hemácias e o músculo, conhecido como **ciclo de Cori,** é discutido em detalhe no Capítulo 21. Neste ponto, discutiremos a via metabólica para a conversão de lactato em glicose.

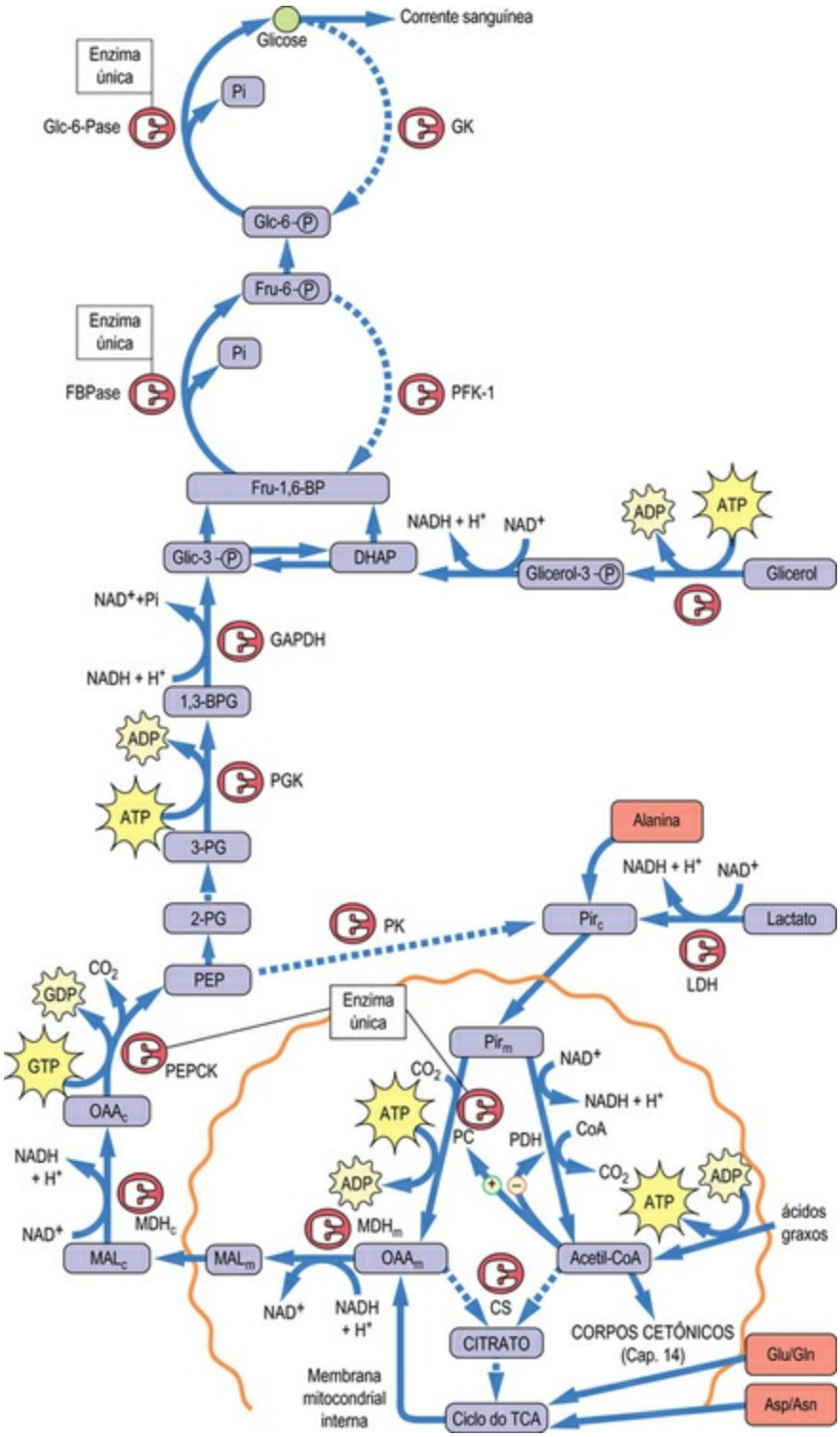


FIG. 13.8 Via da gliconeogênese.
A gliconeogênese é o reverso da glicólise. Enzimas únicas superam as reações irreversíveis das cinases da glicólise. **Compartimentos:** c, meio citoplasmático; imm, membrana mitocondrial interna; m, mitocôndria. **Enzimas:** CS, citrato sintase; Fru-1,6-BPase, frutose 1,6-bifosfatase; GAPDH, gliceraldeído 3-P desidrogenase; Glc-6-Pase, glicose 6-fosfatase; GK, glicocinase; MDH, malato desidrogenase; PC, piruvato carboxilase; PDH, piruvato desidrogenase; PGK, fosfoglicerato cinase. **Substratos:** 2,3-BPG, bifosfoglicerato; DHAP, di-hidroxiacetona fosfato; Fru-1,6-BP, frutose-1,6-bifosfato; Glic-3-P, gliceraldeído 3-fosfato; MAL, malato; OAA, oxaloacetato; PEP, fosfoenolpiruvato; PEPCK, PEP carboxicinase; Pir, piruvato; 3-PG, 3-fosfoglicerato. *Linhas sólidas:* ativo durante a gliconeogênese. *Linhas pontilhadas:* inativo durante a gliconeogênese.

O problema crítico na reversão da glicólise é a superação da irreversibilidade de três reações de cinases: **glicocinase (GK), fosfofrutocinase-1 (PFK-1) e piruvato cinase (PK).** A quarta cinase na glicólise, a fosfoglicerato cinase (PGK) catalisa uma reação de equilíbrio

livremente reversível: uma reação de fosforilação em nível de substrato, transferindo um acil fosfato de alta energia no 1,3-bifosfoglicerato para uma ligação pirofosfato energeticamente similar no ATP. **Para contornar as três reações irreversíveis na glicólise, o fígado usa quatro enzimas: a piruvato carboxilase (PC) na mitocôndria e a fosfoenolpiruvato carboxicinase (PEPCK) no citoplasma para desviar da reação da PK, a frutose-1,6-bifosfatase (Fru-1,6-BPase) para desviar da reação da PFK-1 e a Glc-6-Pase para desviar da reação da GK** (Fig. 13.8). A gliconeogênese a partir do lactato envolve, primeiro, sua conversão em fosfoenolpiruvato (PEP), um processo que necessita de investimento de dois equivalentes de ATP devido à alta energia da ligação enol-fosfato no PEP. O lactato é primeiro convertido em piruvato pela lactato desidrogenase (LDH), que então entra na mitocôndria, onde é convertido a oxaloacetato pela PC, usando a **biotina** e o ATP. O oxaloacetato é reduzido a malato pela malato desidrogenase do ciclo TCA, sai da mitocôndria e é então reoxidado a oxaloacetato pela malato desidrogenase citosólica. O oxaloacetato citosólico é então descarboxilado pela PEPCK, usando GTP como cossubstrato, produzindo PEP. A energia para a síntese de PEP a partir do oxaloacetato é derivada da hidrólise do GTP e da descarboxilação do oxaloacetato.

A glicólise pode agora prosseguir ao contrário a partir do PEP até que alcance a próxima reação irreversível, a catalisada pela PFK-1. Essa enzima é contornada por uma reação de hidrólise simples, catalisada pela Fru-1,6-BPase sem produção de ATP, revertendo a reação da PFK-1 e produzindo Fru-6-P. De modo similar, o desvio da GK é acompanhado pela hidrólise da Glc-6-P pela Glc-6-Pase, sem produção de ATP. A glicose livre é então liberada para o sangue.

A gliconeogênese é relativamente eficiente — o fígado pode produzir um quilo de glicose por dia através da gliconeogênese e, de fato o faz, em pacientes diabéticos hiperglicêmicos e fracamente controlados. A produção normal de glicose, na ausência de carboidrato na dieta, é de cerca de 200 g/dia. A gliconeogênese a partir do piruvato é moderadamente dispendiosa, necessitando de um gasto equivalente a 4 moles de ATP por mol de piruvato convertido em glicose, isto é, 2 moles de ATP na reação da PC e 2 moles de GTP na reação da PEPCK. O ATP e o GTP são fornecidos pela oxidação de ácidos graxos (Cap. 15).

Gliconeogênese a partir de aminoácidos e glicerol

A maioria dos aminoácidos é glicogênica (Cap. 19), isto é, após desaminação, seus esqueletos de carbono podem ser convertidos em glicose. **A alanina e a glutamina são os principais aminoácidos exportados do músculo para a gliconeogênese.** Suas concentrações relativas no sangue venoso proveniente do músculo excedem suas concentrações relativas nas proteínas musculares, indicando considerável remanejamento dos aminoácidos musculares para o fornecimento de substratos glicogênicos. Como discutido em mais detalhe no Capítulo 19, a alanina é convertida diretamente em piruvato pela enzima alanina aminotransferase **(alanina transaminase, ALT),** e então a gliconeogênese procede como descrito para o lactato. Outros aminoácidos são convertidos em intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico (ciclo do

TCA), e então em malato para a gliconeogênese. O aspartato, por exemplo, é convertido em oxaloacetato pela aspartato aminotransferase (**aspartato transaminase,** AST), e o glutamato em α-cetoglutarato pela glutamato desidrogenase. Alguns aminoácidos glicogênicos são convertidos por vias menos diretas em alanina ou em intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico para a gliconeogênese. Os aminogrupos desses aminoácidos são convertidos em ureia, via **ciclo da ureia** nos hepatócitos, e a ureia é excretada na urina (Cap. 19).

O glicerol entra na gliconeogênese no nível das trioses fosfato (Fig. 13.8). Após a liberação de glicerol e dos ácidos graxos a partir do tecido adiposo no plasma, o glicerol capturado pelo fígado é fosforilado pela **glicerol cinase.** Após a ação da glicerol-3-fosfato desidrogenase (Fig. 9.7), o glicerol entra na via gliconeogênica como di-hidroxiacetona fosfato. Somente o componente glicerol das gorduras pode ser convertido em glicose. A incorporação do glicerol em glicose requer apenas 2 moles de ATP por mole de glicose produzida.



Quadro clínico

Criança nascida de mãe malnutrida pode ter hipoglicemia

Uma bebê nasceu após 39 semanas de gestação de mãe jovem malnutrida. A criança também era magra e fraca ao nascimento e, 1 hora após o parto, mostrava sinais de sofrimento, incluindo batimentos cardíacos e respiração rápidos. Sua glicose sanguínea era de 3,5 mmol/L (63 mg/dL) ao nascimento e declinou rapidamente para 1,5 mmol/L (27 mg/dL) após 1 hora, quando ela se tornou irresponsiva e comatosa. Sua condição foi marcadamente melhorada pela infusão de uma solução de glicose, seguida por dieta rica em carboidrato. Ela melhorou gradualmente ao longo das duas semanas seguintes antes de ter alta do hospital.

Comentário

Durante o desenvolvimento no útero, o feto obtém glicose exogenamente, através da circulação placentária. Entretanto, após o nascimento, a criança conta com a mobilização do glicogênio hepático e em seguida com a gliconeogênese para a manutenção da glicose sanguínea. Devido ao estado de subnutrição da mãe, a criança nasceu com reservas hepáticas de glicogênio insignificantes. Assim, ela era incapaz de manter a homeostasia da glicose sanguínea no pós-parto e rapidamente entrou em hipoglicemia, iniciando uma resposta ao estresse. Após sobreviver à hipoglicemia transiente, ela provavelmente ainda tinha falta de massa muscular adequada para fornecer um suprimento suficiente de aminoácidos para a gliconeogênese. A infusão de glicose, seguida por dieta rica em carboidratos, iria suplementar esses déficits, mas poderia não corrigir danos mais sérios devido à má nutrição prolongada durante o desenvolvimento fetal.

A glicose não pode ser sintetizada a partir de ácidos graxos!

Como discutido no Capítulo 15, o metabolismo de ácidos graxos envolve sua conversão em dois passos de oxidação de carbono para formar a acetil-CoA, que então é metabolizada no ciclo do ácido tricarboxílico após a condensação com o oxaloacetato para formar citrato. Enquanto os carbonos do acetato são teoricamente disponíveis para a gliconeogênese pela conversão em malato, durante a via de citrato a malato, duas moléculas de CO_2 são eliminadas nas reações da isocitrato e da α-cetoglutarato desidrogenase. Portanto, embora seja produzida energia no ciclo do ácido tricarboxílico, os dois carbonos investidos para a gliconeogênese a partir da acetil-CoA são perdidos como CO_2. Por essa razão, a acetil-CoA e, portanto, os ácidos graxos com número par de átomos de carbono não podem servir como substrato para a gliconeogênese. Entretanto, os ácidos graxos com número ímpar de átomos de carbono e os ácidos graxos com cadeias ramificadas, que formam propionil-CoA, podem servir como precursores secundários para a gliconeogênese. A propionil-CoA é primeiro carboxilada a metilmalonil-CoA, que sofre reações de racemase e de mutase para formar a succinil-CoA, um intermediário do ciclo do ácido tricarboxílico (Cap. 15). A succinil-CoA é convertida em malato, sai da mitocôndria, e é oxidada a oxaloacetato. Após a descarboxilação pela PEPCK, os três carbonos do propionato são conservados no PEP e na glicose.

Regulação da gliconeogênese

A frutose 2,6-bifosfato contrarregula alostericamente a glicólise e a gliconeogênese

Assim como o metabolismo do glicogênio no fígado, a gliconeogênese é primariamente regulada por mecanismos hormonais. Nesse caso, o processo regulatório envolve uma contrarregulação da glicólise e da gliconeogênese, largamente pela fosforilação/desfosforilação de enzimas, sob controle do glucagon e da insulina. O ponto de controle primário é nas enzimas regulatórias PFK-1 e Fru-1,6-BPase que, no fígado, são extraordinariamente sensíveis ao efetor alostérico **frutose 2,6-bifosfato (Fru-2,6-BP).** A Fru-2,6-BP é um ativador da PFK-1 e um inibidor da Fru-1,6-BPase, contrarregulando as duas vias opostas. Como mostrado na Figura 13.9, a Fru-2,6-BP é sintetizada por uma enzima incomum, **bifuncional, a fosfofrutocinase-2/frutose-2, 6-bifosfatase (PFK-2/Fru-2,6-BPase),** que tem atividades de cinase e de fosfatase. No estado fosforilado, efetuado pelo glucagon através da proteína cinase A, essa enzima mostra atividade de Fru-2,6-BPase, que reduz o nível de Fru-2,6-BP. A redução na Fru-2,6-BP diminui simultaneamente a estimulação da glicólise pela PFK-1 e abranda a inibição da gliconeogênese pela Fru-1,6-BPase. Dessa maneira, a fosforilação mediada pelo glucagon da PFK-2/Fru-2,6-BP coloca o fígado em um modo gliconeogênico. O aumento coordenado, alostericamente mediado, na Fru-1,6-BPase e a diminuição na atividade da PFK-1 asseguram que a glicose produzida pela gliconeogênese não seja consumida pela glicólise em um ciclo fútil, mas liberada na circulação pela Glc-6-Pase. Similarmente, qualquer fluxo de glicose a partir do glicogênio através da glicogenólise, também induzido pelo glucagon, é desviado para o sangue, em vez de para a glicólise, pela inibição da PFK-1. A PK também é inibida pela

fosforilação pela proteína cinase A (PKA), fornecendo um sítio adicional para a inibição da glicólise (Fig. 13.9).

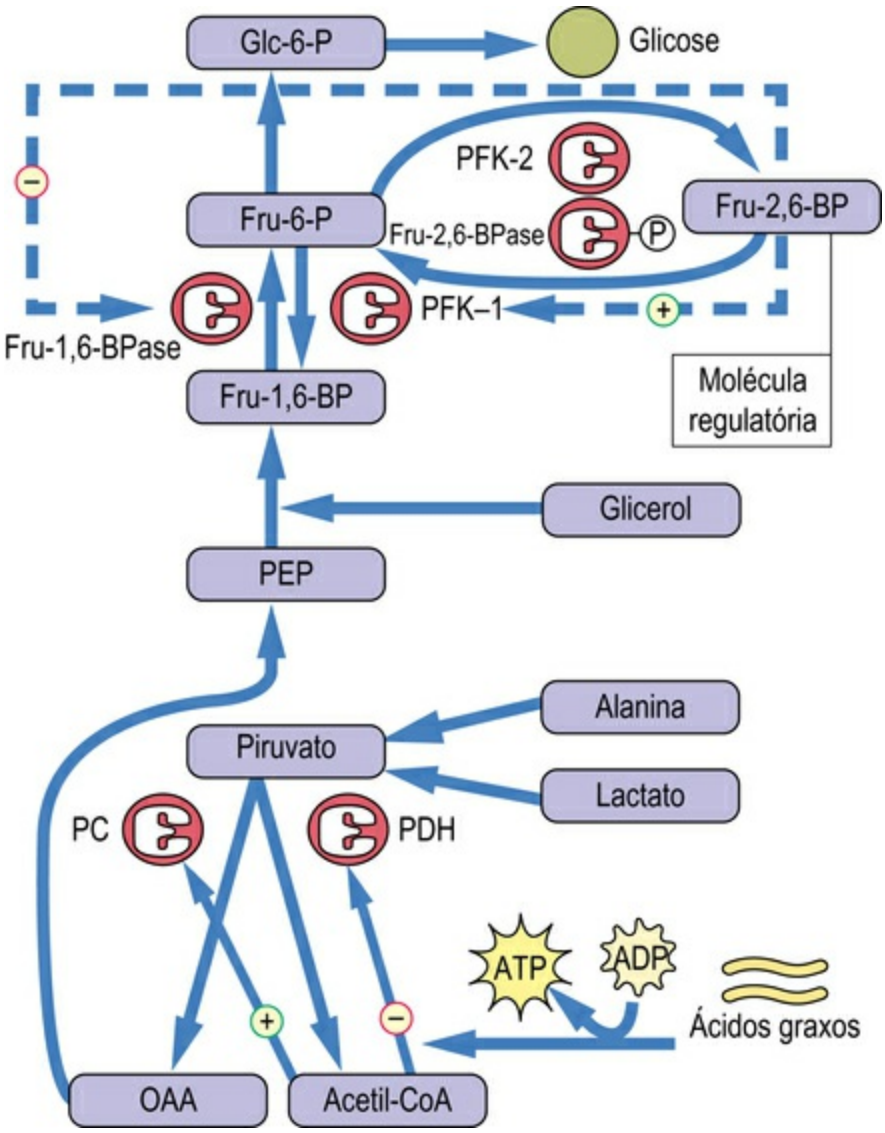


FIG. 13.9 Regulação da gliconeogênese.
A gliconeogênese é regulada pelos níveis hepáticos de Fru-2,6-BP e de acetil-CoA. A parte superior do diagrama foca a regulação recíproca da Fru-1,6-BPase e da PFK-1 pela Fru-2,6-BP, e a parte de baixo, a regulação recíproca da piruvato desidrogenase (PDH) e da piruvato carboxilase (PC) pela acetil-CoA.

Quando a glicose entra no fígado após a refeição, a **insulina** medeia a desfosforilação da PFK-2/Fru-2,6-BPase, ativando sua atividade PFK-2. O aumento resultante na Fru-2,6-BP ativa a PFK-1 e inibe a atividade da Fru-1,6-BPase. A gliconeogênese é inibida, e a glicose que entra no fígado é então incorporada ao glicogênio ou encaminhada para a glicólise para a lipogênese. Assim, o metabolismo hepático após a refeição é focalizado na síntese e no armazenamento de reservas de energia de carboidratos e lipídios, que serão mais tarde usados, no estado pós-absortivo, para a manutenção da glicose sanguínea e homeostasia dos ácidos graxos.

A gliconeogênese também é regulada na mitocôndria pela acetil-CoA. O influxo de ácidos graxos a partir do tecido adiposo, estimulado pelo glucagon para manter a gliconeogênese (Cap. 15), leva a um aumento na acetil-CoA hepática, que é tanto um

inibidor da piruvato desidrogenase (PDH) quanto um ativador alostérico essencial da piruvato carboxilase (PC) (Fig. 13.8). Dessa maneira, o metabolismo de gordura inibe a oxidação do piruvato e favorece seu uso para a gliconeogênese no fígado. No músculo durante o estado de jejum, a utilização da glicose para o metabolismo energético é limitada pelo baixo nível de GLUT-4 nas membranas plasmáticas (por causa da baixa concentração plasmática de insulina) e pela inibição da PDH pela acetil-CoA. O metabolismo ativo de gordura e os altos níveis de acetil-CoA no músculo promovem a excreção de uma fração significante de piruvato como lactato, mesmo no estado de repouso. O esqueleto de carbono da glicose retorna ao fígado através do ciclo de Cori (Cap. 21), e a reciclagem de piruvato em glicose na verdade conserva a proteína muscular.

Conversão de frutose e galactose em glicose

Como discutido em detalhe no Capítulo 27, a frutose é metabolizada quase exclusivamente no fígado. Ela entra na glicólise no nível das trioses fosfato, desviando da reação da enzima regulatória, PFK-1. Após o consumo de sucos de fruta, Gatorade® ou alimentos contendo xarope de milho com elevado teor de frutose, elevadas quantidades de piruvato podem ser forçadas para a mitocôndria para uso no metabolismo energético ou biossíntese de gordura. Durante o estado gliconeogênico, essa frutose também pode prosseguir em direção à Glc-6-P, fornecendo uma fonte conveniente de glicose sanguínea. A gliconeogênese a partir da galactose é igualmente eficiente, já que a Glc-1-P derivada da galactose 1-fosfato (Cap. 27) é facilmente isomerizada a Glc-6-P pela fosfoglicomutase. A frutose e a galactose são boas fontes de glicose independentemente da glicogenólise ou da gliconeogênese.

Resumo

- O glicogênio é armazenado em dois tecidos no corpo por razões diferentes: no fígado para a manutenção a curto prazo da homeostasia da glicose sanguínea e no músculo como fonte de energia. O metabolismo do glicogênio nesses tecidos responde rapidamente ao controle alostérico e hormonal.
- No fígado, o balanço entre a glicogenólise e a glicogênese é regulado pelo balanço entre as concentrações de glucagon e de insulina na circulação, que controla o estado de fosforilação de enzimas. A fosforilação de enzimas sob a influência do glucagon direciona a mobilização de glicogênio e é a condição mais comum no fígado, por exemplo, durante o sono e entre as refeições.
- Aumentos na insulina sanguínea durante e após as refeições promovem a desfosforilação das mesmas enzimas, levando à glicogênese. A insulina também promove a captação de glicose pelo músculo e pelo tecido adiposo para a síntese de glicogênio e triglicerídios após a refeição.
- A epinefrina aumenta a fosforilação de enzimas hepáticas, facilitando uma explosão na glicogenólise hepática e um aumento na glicose sanguínea para as respostas ao estresse.

- O músculo é responsivo à epinefrina, mas não ao glucagon; nesse caso, a glicose produzida pela glicogenólise é usada para o metabolismo energético no músculo — luta ou fuga. Em adição, a glicogenólise no músculo é responsiva ao Ca^{2+} intracelular e às concentrações de AMP, fornecendo um mecanismo para o acoplamento da glicogenólise ao consumo normal de energia durante o exercício.
- A gliconeogênese ocorre primariamente no fígado e é direcionada para a manutenção da glicose sanguínea durante o estado de jejum. Ela é essencial após 12 horas de jejum, quando a maioria do glicogênio hepático foi consumida.
- Os principais substratos para a gliconeogênese são o lactato, os aminoácidos e o glicerol; o metabolismo de ácidos graxos fornece a energia. O principal ponto de controle é no nível da fosfofrutocinase-1 (PFK-1), que é ativada pelo efetor alostérico Fru-2,6-BP.
- A síntese de Fru-2,6-BP está sob controle da enzima bifuncional PFK-2/Fru-2,6-BPase, cujas atividades cinase e fosfatase são reguladas pela fosforilação/desfosforilação, sob controle hormonal pela insulina e glucagon.
- Durante o jejum e a gliconeogênese ativa, o glucagon medeia a fosforilação e a ativação da atividade fosfatase dessa enzima, levando a uma diminuição no nível de Fru-2,6-BP e a uma redução correspondente na glicólise; a degradação de carboidratos é inibida, e as gorduras se tornam a fonte primária de energia durante o jejum e a inanição. A oxidação do piruvato também é inibida na mitocôndria pela inibição da PDH pela acetil-CoA derivada do metabolismo de gordura.
- Após a refeição, a diminuição na fosforilação de enzimas aumenta a atividade da PFK-2; o aumento na concentração de Fru-2,6-BP ativa a PFK-1 e promove a glicólise, fornecendo piruvato, que é convertido a acetil-CoA para a lipogênese. As ações da insulina, glucagon e epinefrina ilustram muitos dos princípios fundamentais da ação hormonal (Tabela 13.5).

Tabela 13.5

Características gerais da ação hormonal

Especificidade tecidual, determinada pela distribuição do receptor
Várias etapas, amplificação em cascata
Mensageiros secundários intracelulares
Contrarregulação coordenada de vias opostas
Aumento e/ou oposição por outros hormônios
Múltiplos mecanismos de terminação da resposta

A regulação hormonal do metabolismo da glicose ilustra os princípios fundamentais da ação hormonal (Cap. 39).

Questões para aprendizagem

1. A inativação da glicogênese em resposta à epinefrina ocorre em um único passo pela ação da PKA na glicogênio sintase, enquanto a ativação da glicogenólise envolve uma enzima intermediária, a fosforilase cinase, que fosforila a fosforilase. Discuta as vantagens metabólicas da ativação em dois passos da glicogenólise.
2. Investigue o uso de inibidores da gliconeogênese para o tratamento do diabetes tipo 2.
3. A glicose-6-fosfatase é essencial para a produção de glicose no fígado, mas não é uma enzima citosólica. Descreva a atividade e a localização subcelular dessa enzima e os estágios finais da via para a produção de glicose no fígado.

Leituras sugeridas

Angelini, C., Semplicini, C. Enzyme replacement therapy for Pompe disease. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2012; 12:70–75.

Hicks, J., Wartchow, E., Mierau, G. Glycogen storage diseases: a brief review and update on clinical features, genetic abnormalities, pathologic features, and treatment. *Ultrastruct Pathol*. 2011; 35:183–196.

Johnson, R. J., Murray, R. Fructose, exercise, and health. *Curr Sports Med Rep*. 2010; 9:253–258.

Obel, L. F., Müller, M. S., Walls, A. B., et al. Brain glycogen – new perspectives on its metabolic function and regulation at the subcellular level. *Front Neuroenergetics*. 2012; 4:3.

Roach, P. J., Depaoli-Roach, A. A., Hurley, T. D., et al. Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes. *Biochem J*. 2012; 441:763–787.

Schutz, Y. Protein turnover, ureagenesis and gluconeogenesis. *Int J Vitam Nutr Res*. 2011; 81:101–107.

Stanhope, K. L. Role of fructose-containing sugars in the epidemics of obesity and metabolic syndrome. *Annu Rev Med*. 2012; 63:329–343.

Stanley, C. A. Hypoglycemia in the neonate. *Pediatr Endocrinol Rev*. 2006; 4(Suppl 1):76–81.

Sites

Gluconeogenesis: www.rpi.edu/dept/bcbp/molbiochem/MBWeb/mb1/part2/ 9-glycogen.ppt.

Glycogen. www.rpi.edu/dept/bcbp/molbiochem/MBWeb/mb1/part2/10-gluconeo.ppt.

CAPÍTULO 14

O Ciclo do Ácido Tricarboxílico

L. William Stillway

Objetivos

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Resumir a sequência de reações do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e explicar o propósito do ciclo.
- Identificar as quatro enzimas oxidativas no ciclo do TCA e seus produtos.
- Identificar os dois intermediários necessários na primeira etapa do ciclo do TCA e suas fontes metabólicas.
- Identificar os quatro principais intermediários metabólicos sintetizados a partir de intermediários do ciclo do TCA.
- Descrever como o ciclo do TCA é regulado pelo suprimento de substrato, efetores alostéricos, modificação covalente e síntese proteica.
- Explicar por que não existe síntese líquida da glicose a partir da acetil-CoA.
- Explicar o conceito de "substrato suicida" como aplicado no ciclo do TCA.

Introdução

Localizado na mitocôndria, o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), também conhecido como ciclo de Krebs ou ciclo do ácido cítrico, é uma via comum do metabolismo para todos os combustíveis. Ele retira oxidativamente elétrons da acetil-CoA, que é o produto comum do catabolismo das gorduras, carboidratos e proteínas, produzindo a maioria das coenzimas reduzidas que são usadas para gerar o trifosfato de adenosina (ATP) na cadeia transportadora de elétrons. Embora o ciclo do TCA não utilize oxigênio em nenhuma das reações, ele necessita do metabolismo oxidativo na mitocôndria para a reoxidação das coenzimas reduzidas. O ciclo do TCA possui duas funções principais: produção de energia e biossíntese (Fig. 14.1).

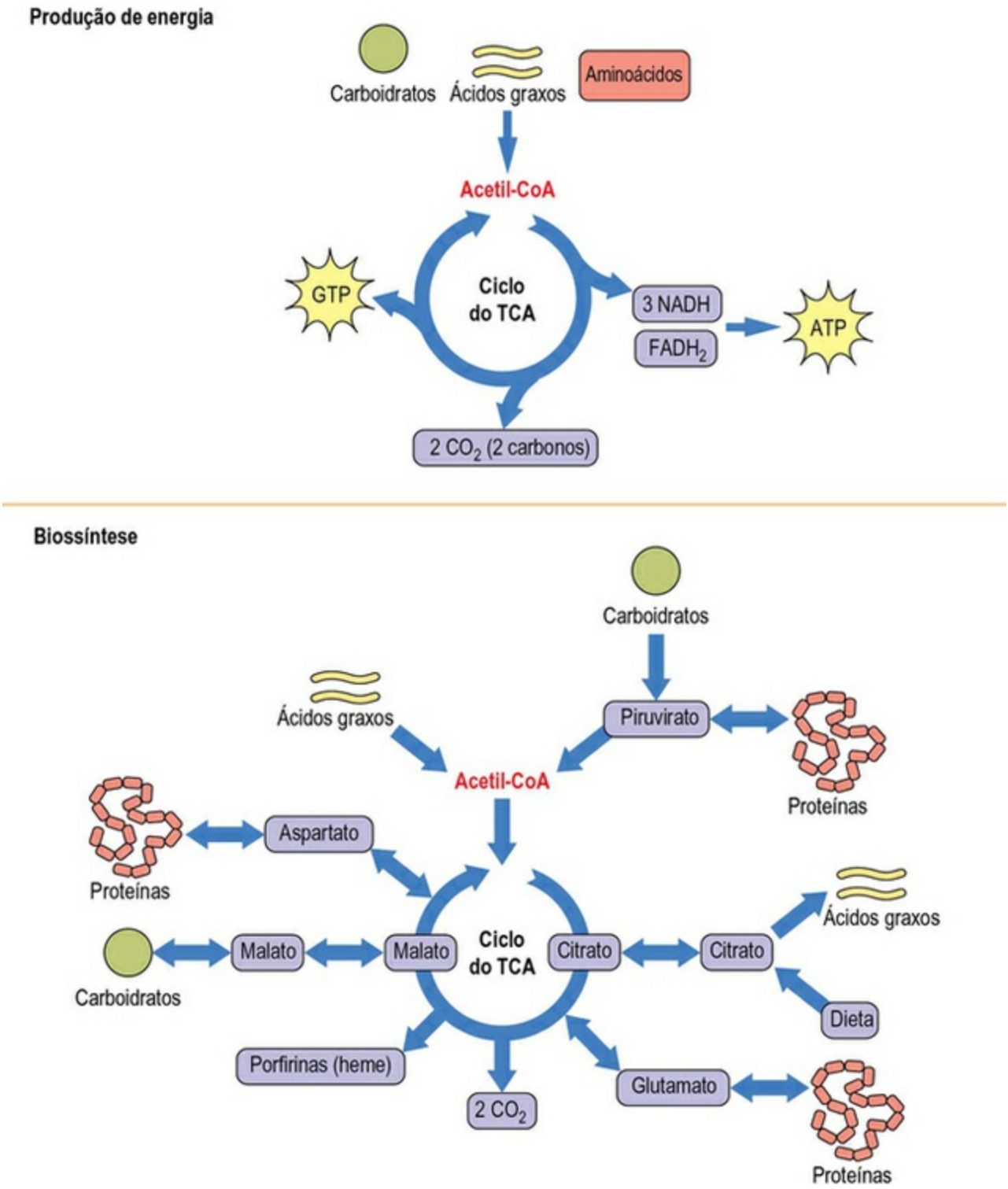


FIG. 14.1 Natureza anfibólica do ciclo do TCA. O ciclo do TCA fornece energia e metabólitos para o metabolismo celular. Devido à natureza catabólica (em cima) e anabólica (embaixo) do ciclo do TCA, ele é descrito como anfibólico. A acetil-CoA é o intermediário comum entre os combustíveis metabólicos e o ciclo do TCA. $FADH_2$, flavina adenina dinucleotídio reduzida; GDP, difosfato de guanosina; NADH, nicotinamida adenina dinucleotídio reduzida.

Funções do ciclo do ácido tricarboxílico

Quatro etapas oxidativas fornecem energia livre para a síntese do ATP

Um produto final comum do metabolismo dos carboidratos, ácidos graxos e aminoácidos, a acetil-CoA (Fig. 14.2) é oxidada no ciclo do TCA para produzir coenzimas

reduzidas em quatro reações redox por volta do ciclo. Três produzem nicotinamida adenina dinucleotídio reduzida (NADH) e a outra produz flavina adenina dinucleotídio reduzida ($FADH_2$) (Fig. 9.4). Estes nucleotídios reduzidos fornecem energia para a síntese de ATP pelo sistema de transporte de elétrons (Cap. 9). Um fosfato de alta energia, a trifosfato de guanosina (GTP), é também produzido no ciclo pela fosforilação em nível de substrato. Praticamente todo o dióxido de carbono metabólico é produzido por reações de descarboxilação catalisadas pela piruvato desidrogenase e por enzimas do ciclo do TCA na mitocôndria.

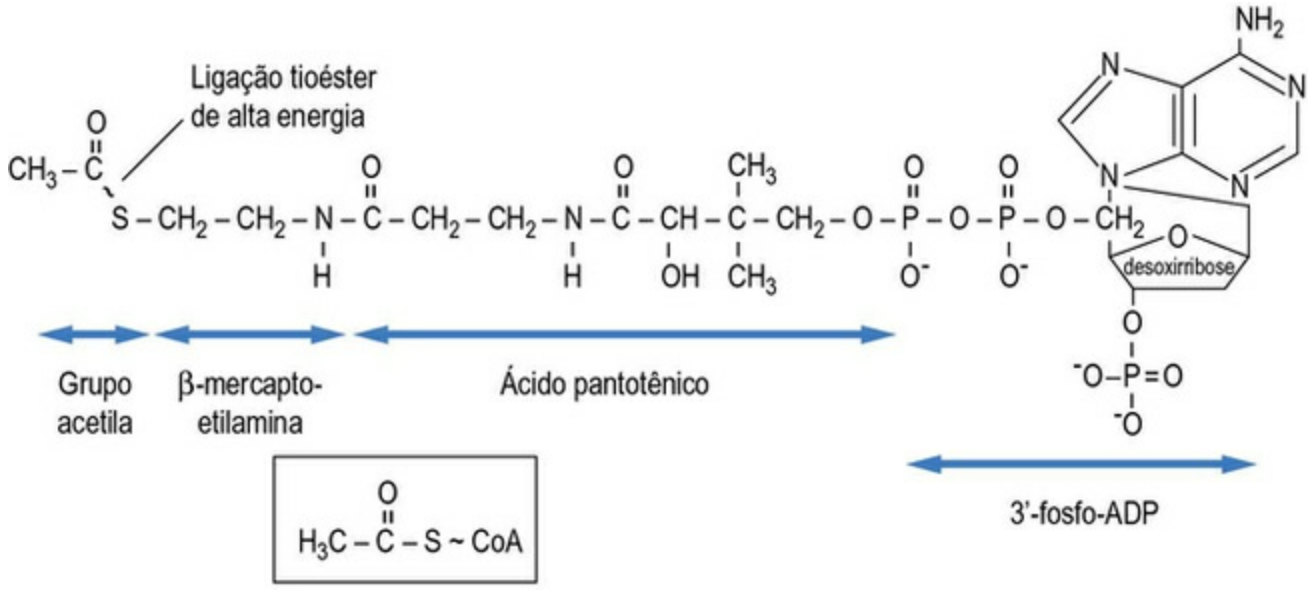


FIG. 14.2 Estrutura da acetil-CoA. A coenzima A é um nucleotídio de adenina, contém uma fração de ácido pantotênico e termina em um grupo tiol. O grupo acetila está ligado ao grupo tiol através de uma ligação tioéster de alta energia.

O ciclo do TCA fornece uma base comum para a interconversão de combustíveis e metabólitos

Em adição ao seu papel no catabolismo, o ciclo do TCA (Fig. 14.1) participa da síntese da glicose a partir dos aminoácidos e de lactato durante a inanição e o jejum (gliconeogênese, Cap. 13). Está envolvido também na conversão dos carboidratos em gordura após uma refeição rica em carboidratos (Cap. 16). Ele é uma fonte de aminoácidos não essenciais, como o aspartato e glutamato, que são sintetizados diretamente a partir de intermediários do ciclo do TCA. Um intermediário do ciclo do TCA, a succinil-coenzima A (succinil CoA), serve como precursor para as porfirinas (heme), em todas as células, mas especialmente na medula óssea e no fígado (Cap. 30). As reações biossintéticas derivadas do ciclo do TCA necessitam da entrada de carbonos a partir de outros intermediários que não a acetil-CoA. Tais reações são conhecidas como reações anapleróticas (de preenchimento).

A acetil-CoA é um produto comum de várias vias catabólicas

O ciclo do TCA inicia-se com a acetil-CoA (Fig. 14.2), que possui três precursores

metabólicos principais. Os carboidratos sofrem glicólise gerando piruvato (Cap. 12), que pode ser incorporado pela mitocôndria e descarboxilado oxidativamente para acetil-CoA pelo complexo piruvato desidrogenase. Durante a lipólise, os triacilgliceróis são convertidos em glicerol e ácidos graxos livres, que são captados pelas células e transportados para as mitocôndrias quando, então, sofrem oxidação a acetil-CoA (Cap. 15). Finalmente, a proteólise das proteínas teciduais libera os aminoácidos constituintes, muitos dos quais são metabolizados a acetil-CoA e em intermediários do ciclo do TCA (Cap. 19).

A primeira versão do ciclo do TCA, proposta por Krebs em 1937, iniciava com o ácido pirúvico, não pela acetil-CoA. O ácido pirúvico era descarboxilado e condensado com o ácido oxaloacético, através de um mecanismo desconhecido, para formar ácido cítrico. O intermediário essencial, acetil-CoA, foi identificado anos depois. É tentador iniciar o ciclo do TCA com o ácido pirúvico, a menos que seja reconhecido que ácidos graxos e muitos aminoácidos formam acetil-CoA por vias que não incluem o piruvato. É por essa razão que se afirma que o ciclo do TCA é iniciado com a acetil-CoA, não com o ácido pirúvico.

O ciclo do TCA está localizado na matriz mitocondrial

A localização do ciclo do TCA na matriz mitocondrial é importante metabolicamente; isso permite que intermediários idênticos sejam utilizados dentro e fora da mitocôndria com propósitos diferentes. A acetil-CoA, por exemplo, não pode atravessar a membrana mitocondrial interna. O destino principal da acetil-CoA mitocondrial é sua oxidação no ciclo do TCA, mas, no citoplasma, ela é utilizada para a biossíntese de ácidos graxos e colesterol.

Os defeitos metabólicos no ciclo do TCA são raros

Os defeitos metabólicos envolvendo enzimas do ciclo do TCA são raros, porque o funcionamento do ciclo é absolutamente essencial para a manutenção da vida. Os produtos das vias produtoras de energia devem ser metabolizados no ciclo do TCA para a produção eficiente de ATP. Qualquer defeito no ciclo do TCA limitará produção de ATP, e células privadas de ATP morrem rapidamente ou são altamente prejudicadas funcionalmente. Os tecidos que utilizam oxigênio em alta velocidade, como o sistema nervoso central e os músculos, são os mais suscetíveis a esses defeitos.

Piruvato carboxilase

O piruvato pode ser convertido diretamente a quatro metabólitos diferentes

O piruvato está em uma encruzilhada no metabolismo. Ele pode ser convertido em um passo a lactato (lactato desidrogenase), a alanina (alanina aminotransferase, ALT), a oxaloacetato (piruvato carboxilase) e a acetil-CoA (complexo piruvato desidrogenase) (Fig. 14.3). Dependendo das circunstâncias metabólicas, o piruvato pode ser direcionado para a gliconeogênese (Cap. 13), para a biossíntese de ácidos graxos (Cap. 16) ou para o próprio ciclo do TCA. A piruvato carboxilase, como a maioria das outras carboxilases,

utiliza CO_2 e a coenzima biotina (Fig. 14.4), uma vitamina hidrossolúvel, e ATP para impulsionar a reação de carboxilação. A enzima é um tetrâmero de subunidades idênticas, cada uma delas contendo um sítio alostérico que liga a acetil-CoA, um modificador heterotrópico positivo. De fato, a piruvato carboxilase possui uma necessidade absoluta de acetil-CoA; a enzima não trabalha na sua ausência. Uma abundância de acetil-CoA mitocondrial age como um sinal para a geração de oxaloacetato adicional. Por exemplo, quando a lipólise é estimulada, os níveis de acetil-CoA intramitocondrial elevam-se, o que alostericamente ativa a piruvato carboxilase a produzir oxaloacetato adicional para a gliconeogênese (Cap. 13).

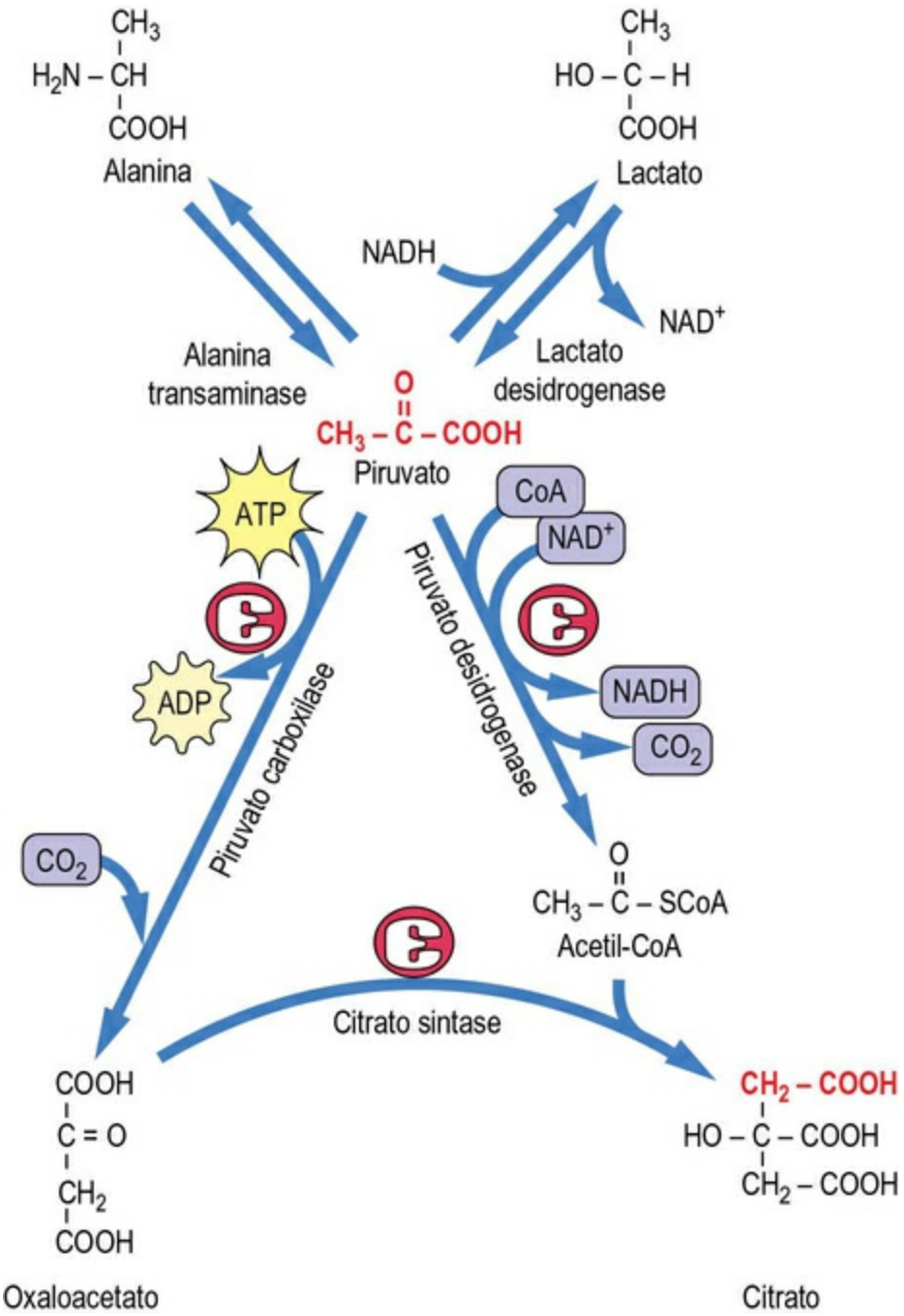


FIG. 14.3 O piruvato está em uma encruzilhada do metabolismo.
O piruvato é rapidamente formado a partir do lactato ou da alanina. A acetil-CoA e o oxaloacetato são derivados do piruvato através da ação catalítica da piruvato desidrogenase e da piruvato carboxilase, respectivamente. ADP, adenosina difosfato.

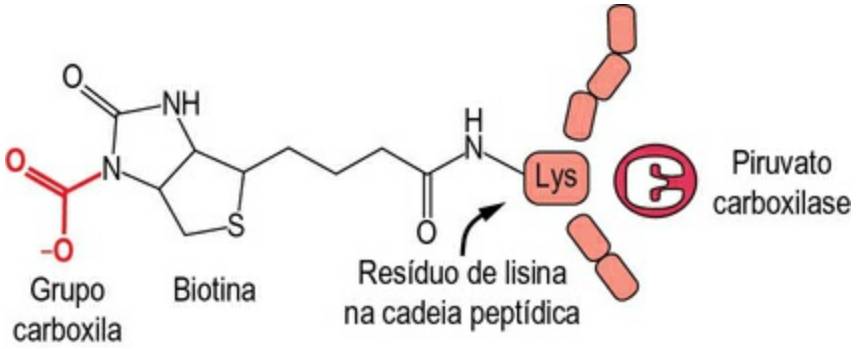


FIG. 14.4 O intermediário carboxil-biotina.
A piruvato carboxilase catalisa a carboxilação do piruvato em oxaloacetato. A coenzima biotina está covalentemente ligada à piruvato carboxilase e transfere o carbono originário do CO_2 para o piruvato (Cap. 11).

O complexo piruvato desidrogenase

O complexo piruvato desidrogenase (CPD) serve como uma ponte entre os carboidratos e o ciclo do TCA (Fig. 14.5). O CPD é uma das várias α-cetoácido desidrogenases com mecanismos de reação análogos, incluindo a α-cetoglutarato desidrogenase do ciclo do TCA e as α-cetoácido desidrogenases associadas ao catabolismo de leucina, isoleucina e valina. Sua irreversibilidade explica em parte por que a acetil-CoA não pode produzir uma síntese líquida de glicose (ver adiante). O complexo funciona como uma unidade consistindo em três enzimas principais:

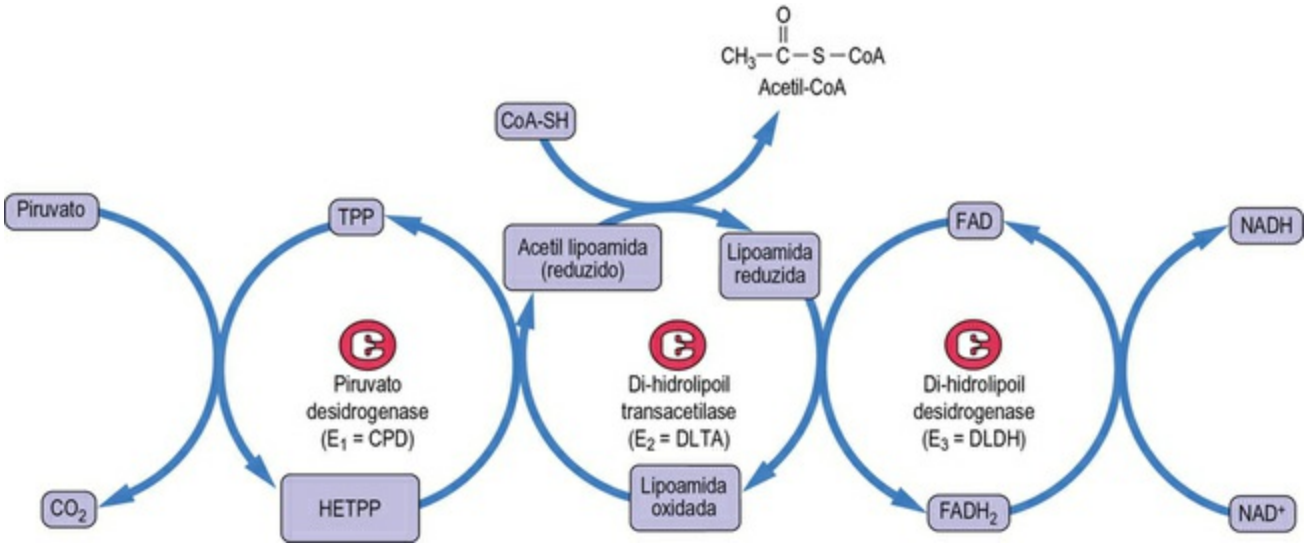


FIG. 14.5 Mecanismo de ação do complexo piruvato desidrogenase.
As três enzimas componentes do complexo piruvato desidrogenase são a piruvato desidrogenase (E_1 = PHD), di-hidrolipoil transacetilase (E_2 = DLTA) e a di-hidrolipoil desidrogenase (E_3 = DLDH). O piruvato é primeiro descarboxilado pela enzima contendo tiamina pirofosfato (E_1), formando CO_2 e hidroxietil-tiamina pirofosfato (HETPP). A lipoamida, o grupo prostético na E_2, serve como um carreador na transferência de uma unidade de dois carbonos do HETPP para a coenzima A (CoA). A forma oxidada, um dissulfeto cíclico, da lipoamida aceita o grupo hidroxietil da HETPP. A lipoamida é reduzida e o grupo hidroxietil convertido em um grupo acetil durante esta reação de transferência, formando acetil di-hidrolipoamida. Após a transferência do grupo acetil para a CoA, a E_3 reoxida a lipoamida, utilizando FAD, e o $FADH_2$ é, por sua vez, oxidado pelo NAD^+, gerando NADH. A reação líquida é: Pir + NAD^+ + CoA-SH → acetil-CoA + NADH + H^+ + CO_2.

- piruvato desidrogenase
- di-hidrolipoil transacetilase
- di-hidrolipoil desidrogenase

Quadro de teste clínico

Medidas de lactato

O ácido lático é medido em um cenário clínico porque seu acúmulo pode resultar em uma morte rápida. O ácido lático é produzido metabolicamente pela redução reversível do piruvato com NADH pela enzima lactato desidrogenase (LDH). Tanto o lactato quanto o piruvato coexistem nos sistemas metabólicos e a relação piruvato: lactato é aproximadamente proporcional à relação citosólica de NAD^+/NADH. O lactato e o piruvato contribuem para a acidez dos líquidos biológicos; no entanto, o lactato está geralmente presente em maiores concentrações e é mais facilmente dosado. O lactato sanguíneo pode aumentar na doença pulmonar obstrutiva crônica e durante o exercício intenso. Sua medição é normalmente indicada quando há acidose metabólica, caracterizada por um elevado intervalo aniônico (ânion *gap*), $[Na^+] - ([Cl^-] + [HCO_3^-])$, indicando a presença de ânion(s) desconhecido(s) no plasma. Embora rara, a acidose lática pode ser causada por defeitos metabólicos em vias produtoras de energia, como algumas das doenças de armazenamento de glicogênio ou em qualquer enzima das

vias do piruvato para gerar ATP, incluindo o complexo piruvato desidrogenase, o ciclo do TCA, o sistema de transporte de elétrons ou a ATP sintase.

Os intermediários são ligados ao componente transacetilase do complexo durante a sequência de reações (Figs. 14.5 e 14.6). Isso otimiza a eficiência catalítica da enzima uma vez que não há equilíbrio do substrato na solução.

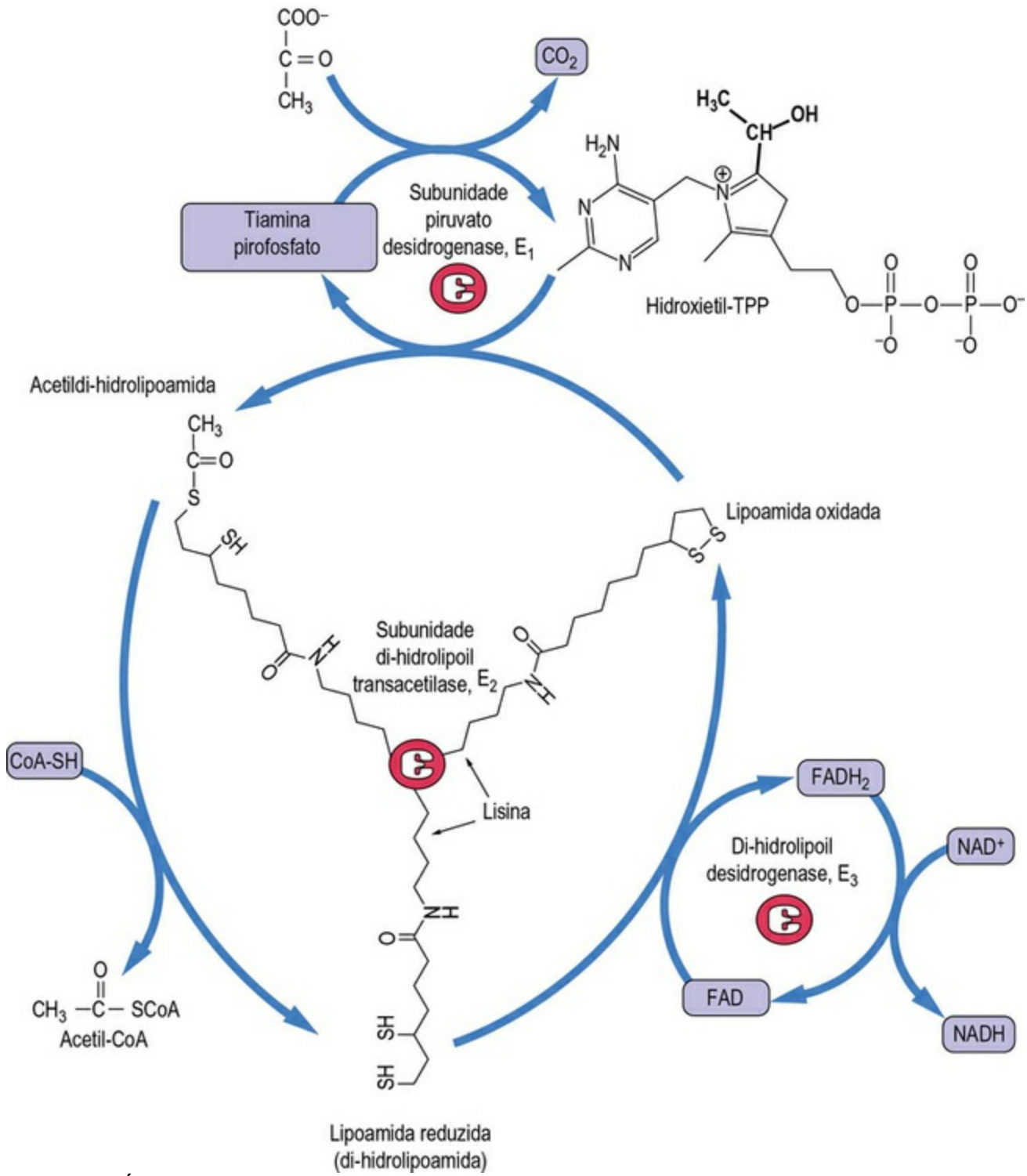


FIG. 14.6 Ácido lipoico no complexo piruvato desidrogenase. A coenzima lipoamida está ligada a um resíduo de lisina na subunidade transacetilase da piruvato desidrogenase. A lipoamida se move de um sítio a outro na subunidade transacetilase através de um mecanismo de "braço giratório". As estruturas da tiamina pirofosfato (TPP) e da lipoamida são mostradas.

Duas enzimas adicionais do complexo, a piruvato desidrogenase cinase e a piruvato desidrogenase fosfatase, regulam sua atividade pela modificação covalente via fosforilação/desfosforilação reversível. Há quatro isoformas conhecidas de cinases e duas de fosfatases; as quantidades relativas de cada uma delas são células-específicas.

Cinco coenzimas são necessárias para a atividade de CPD: tiamina pirofosfato, lipoamida (ácido lipoico ligado por uma ligação amida à proteína), CoA, FAD e NAD^+. Quatro vitaminas são necessárias para sua síntese: tiamina, ácido pantotênico, riboflavina e nicotinamida. A deficiência em qualquer uma destas vitaminas tem efeitos óbvios no metabolismo energético. Por exemplo, o aumento nas concentrações celulares de piruvato e de α-cetoglutarato é encontrado no **beribéri** por causa da deficiência de tiamina (Cap. 11). Neste caso, todas as proteínas estão disponíveis, mas a coenzima importante não está, e as conversões do piruvato para acetil-CoA e do α-cetoglutarato para succinil-CoA estão significativamente reduzidas. Os sintomas incluem debilidade cardíaca e dos músculos esqueléticos e doença neurológica. A deficiência de tiamina é comum no **alcoolismo** porque as bebidas destiladas são desprovidas de vitaminas, e os sintomas do beribéri são frequentemente observados.



Quadro clínico

Deficiência no complexo piruvato desidrogenase

A maioria das crianças com essa deficiência enzimática apresenta na infância uma demora no desenvolvimento e tonicidade muscular reduzida frequentemente associada a ataxia e convulsões. Algumas crianças possuem malformações congênitas no cérebro.

Comentário

Sem a oxidação mitocondrial, o piruvato é reduzido a lactato. O rendimento de ATP a partir da glicólise anaeróbica é menos de um décimo daquele produzido a partir da oxidação completa da glicose através do ciclo do ácido tricarboxílico. O diagnóstico é feito pelo lactato elevado, mas com uma taxa lactato:piruvato normal, ou seja, não há evidência de hipoxia. Uma dieta cetogênica e com restrição grave de proteínas (<15%) e carboidratos (<5%) melhora o desenvolvimento mental. Tal tratamento garante que as células utilizem acetil-CoA a partir do metabolismo de gorduras. Algumas poucas crianças mostram uma redução no lactato plasmático no tratamento com altas doses de tiamina, mas as perspectivas são geralmente ruins.

Enzimas e reações do ciclo do ácido tricarboxílico

O ciclo do TCA é uma sequência de reações para oxidação da acetil-CoA a CO_2, formando nucleotídios reduzidos

O ciclo do TCA é uma sequência de oito reações enzimáticas (Fig. 14.7), iniciando-se com

a condensação da acetil-CoA com o oxaloacetato para formar citrato. O oxaloacetato é regenerado ao completar-se o ciclo. Das quatro oxidações no ciclo, duas envolvem descarboxilações. Três desidrogenases produzem NADH e uma produz $FADH_2$. O GTP, um fosfato de alta energia, também é produzido em uma etapa pela fosforilação em nível de substrato.

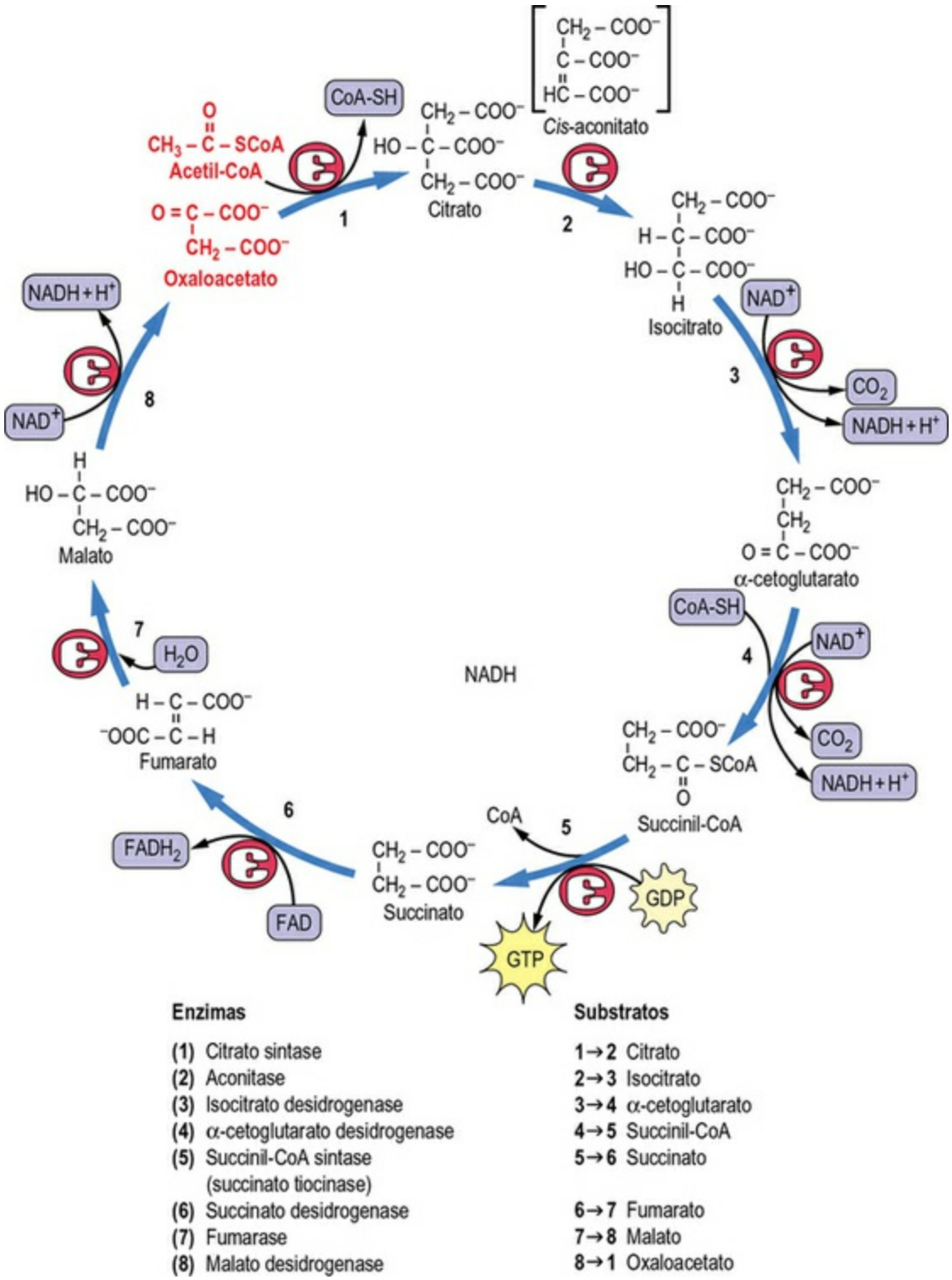


FIG. 14.7 Enzimas e intermediários do ciclo do TCA.

Citrato sintase

A citrato sintase inicia o ciclo do TCA catalisando a condensação da acetil-CoA e do oxaloacetato para formar ácido cítrico. A reação é impulsionada pela clivagem da ligação tioéster de alta energia do citroil-CoA, um intermediário da reação. Uma enzima posterior do ciclo do TCA, a succinil-CoA sintetase, utiliza a ligação tioéster de alta energia da succinil-CoA para produzir GTP, um fosfato de alta energia (Fig. 14.7).

Aconitase

A aconitase é uma proteína ferro-enxofre (Cap. 9) que isomeriza o citrato a isocitrato através do intermediário *cis*-aconitato ligado à enzima. A reação de duas etapas é reversível e envolve a desidratação seguida por hidratação. Embora o citrato seja uma molécula simétrica, a aconitase trabalha especificamente na extremidade oxaloacetato do citrato, não na extremidade derivada da acetil-CoA (Fig. 14.9). Tal especificidade estereoquímica ocorre devido à geometria do sítio ativo da aconitase (Figs. 14.10 e 14.11). Uma proteína citosólica com atividade de aconitase, conhecida como IRE-BP (proteína de ligação de elemento de resposta a ferro) funciona na regulação do armazenamento do ferro.

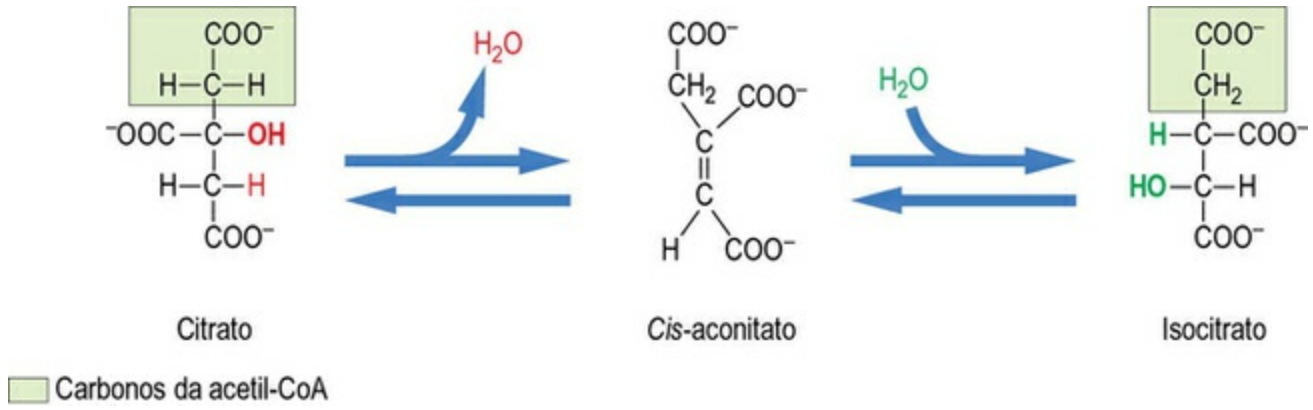


FIG. 14.9 A especificidade da isomerização durante a reação da aconitase.

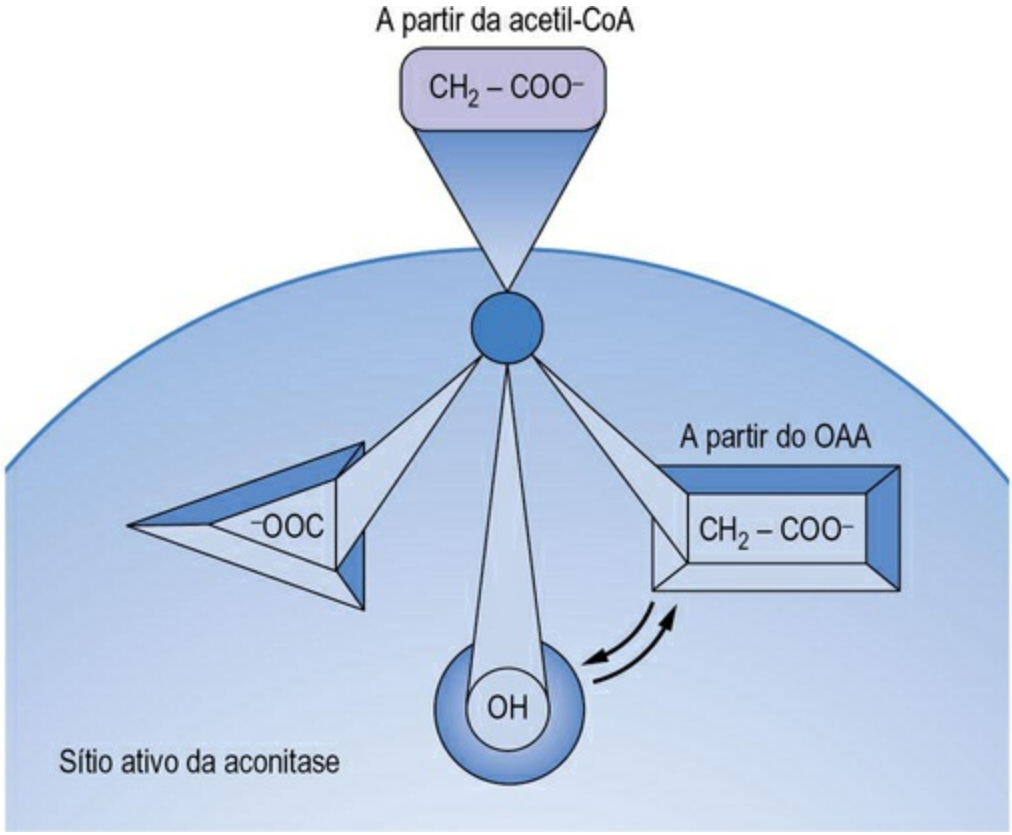


FIG. 14.10 Estereoquímica da reação da aconitase.
A aconitase converte o citrato aquiral em uma forma quiral específica de isocitrato. A ligação adjacente do grupamento hidroxila (OH) no carbono 3 e dos grupos carboxilatos (COO^-) do citrato na superfície da enzima coloca o grupo carboximetil ($—CH_2—COO^-$), derivado da extremidade oxaloacetato da molécula, em contato com o terceiro lócus de ligação no sítio ativo da aconitase. Isso garante a transferência do grupo OH para o grupo CH_2 derivado do oxaloacetato, indicado pelas setas, em vez de para aquele derivado do grupo acetil. OAA, oxaloacetato.

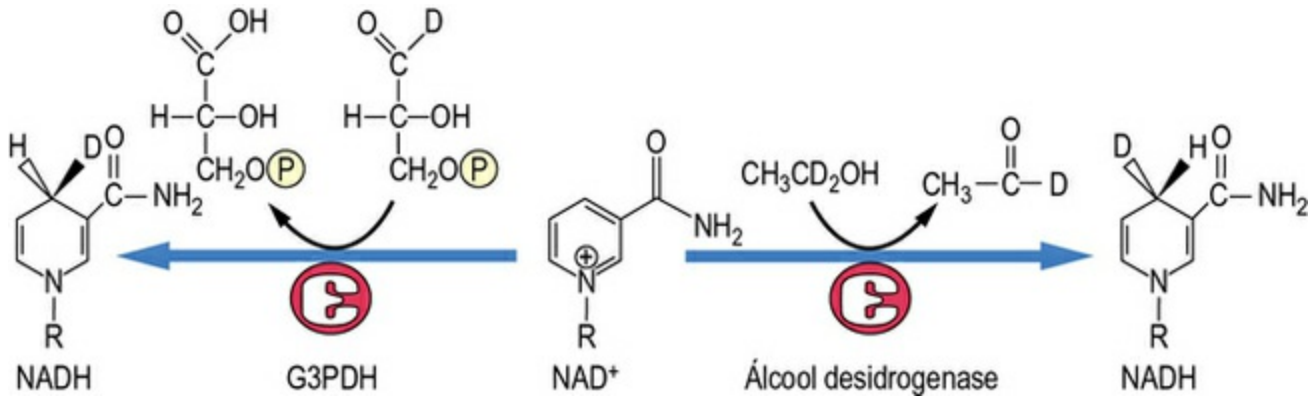


FIG. 14.11 Estereoquímica da redução do NAD+ por desidrogenases. A álcool desidrogenase coloca o íon hidrogênio na face frontal do anel de nicotinamida, enquanto a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (G3PDH) coloca o hidrogênio na face posterior do anel. As duas posições podem ser diferenciadas usando-se substratos marcados com deutério (D).

Quadro de conceitos avançados

Toxicidade do fluoroacetato – um substrato suicida

O fluoroacetato, inicialmente isolado de plantas, é uma potente toxina. Ele é ativado pelo fluoroacetil-CoA e então condensado com o oxaloacetato para formar fluorocitrato (Fig. 14.8). A morte resulta da inibição do ciclo do TCA pelo 2-fluorocitrato, um potente inibidor da aconitase. O fluoroacetato é um exemplo de "substrato suicida", um composto que não é tóxico *per se*, mas é metabolicamente ativado em um produto tóxico. Então, a célula é dita suicida por converter um substrato aparentemente inofensivo em uma toxina letal. Processos semelhantes estão envolvidos na ativação de muitos pró-carcinógenos ambientais que induzem mutações no DNA.

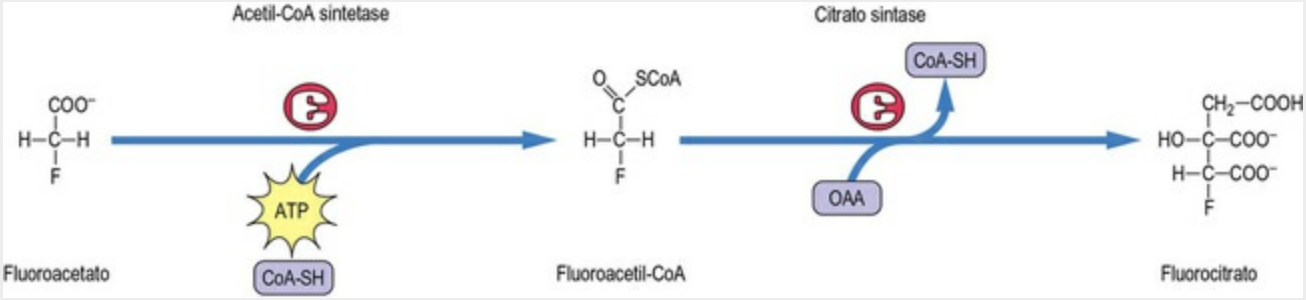


FIG. 14.8 A toxicidade do fluoroacetato — um substrato suicida.
O fluoroacetato é um inibidor competitivo da aconitase. OAA, oxaloacetato.

Isocitrato desidrogenase e α-cetoglutarato desidrogenase

A isocitrato desidrogenase e o complexo *α*-cetoglutarato desidrogenase catalisam duas reações de descarboxilação oxidativa sequenciais nas quais o NAD^+ é reduzido a NADH e o CO_2 é liberado. A primeira destas enzimas, a isocitrato desidrogenase, catalisa a conversão do isocitrato em *α*-cetoglutarato. Ela é uma importante enzima reguladora que é inibida sob condições ricas em energia pelos altos níveis de NADH e ATP, e é ativada quando o NAD^+ e o ADP são produzidos pelo metabolismo. A inibição dessa enzima após uma refeição rica em carboidratos causa um acúmulo intramitocondrial de citrato, o qual é então exportado para o citosol para a lipogênese (Cap. 16). O citrato é também um efetor alostérico, inibindo a fosfofrutocinase-1 (Cap. 13) e ativando a acetil-CoA carboxilase (Cap. 16).

Quadro de conceitos avançados

Estereoespecificidade de enzimas

A aconitase catalisa a isomerização na extremidade oxaloacetato da molécula de citrato. No entanto, o citrato não possui centros assimétricos; ele é aquiral. Como a aconitase conhece qual é a "extremidade superior"? A resposta reside na natureza da ligação do citrato no sítio ativo da aconitase, um processo conhecido como ligação em três pontos. Como ilustrado na Figura 14.10, devido à geometria do sítio ativo da aconitase, existe somente uma forma para o citrato ligar-se. Esta "ligação de três

pontos" coloca os carbonos do oxaloacetato na orientação apropriada para a reação de isomerização, enquanto os carbonos derivados da acetil-CoA são excluídos do sítio ativo.

Embora o citrato seja uma molécula simétrica ou aquiral, ele é denominado "proquiral" porque é convertido em uma molécula quiral, o isocitrato. Tipos semelhantes de processos de ligação de três pontos estão envolvidos nas reações de transaminases que produzem exclusivamente L-aminoácidos a partir de cetoácidos. A redução do anel de nicotinamida pelas desidrogenases dependentes de NAD(H) é também estereoespecífica. Algumas desidrogenases colocam o hidrogênio adicionando exclusivamente na face frontal do anel de nicotinamida (visualizado com o grupo amida à direita), enquanto outras adicionam o hidrogênio somente na face posterior (Fig. 14.11 e Cap. 6).

A segunda desidrogenase, o complexo α-cetoglutarato desidrogenase, catalisa a descarboxilação oxidativa do α-cetoglutarato a NADH, CO_2 e succinil-CoA, um composto tioéster de alta energia. Tal como o complexo piruvato desidrogenase, este complexo enzimático contém três subunidades que possuem as mesmas designações da piruvato desidrogenase (E1, E2 e E3). A E3 é idêntica nos dois complexos e é codificada pelo mesmo gene. Os mecanismos de reação e os cofatores tiamina pirofosfato, lipoato, CoA, FAD e NAD^+ são os mesmos. Ambas as enzimas iniciam com um α-cetoácido, piruvato ou α-cetoglutarato, e ambas formam ésteres de CoA, acetil-CoA ou succinil-CoA, respectivamente.

Neste ponto, o rendimento de carbono do ciclo do TCA é zero, ou seja, dois carbonos foram introduzidos como acetil-CoA e dois foram liberados na forma de CO_2. Observa-se, no entanto, que por causa da assimetria da reação da aconitase, nenhuma molécula de CO_2 produzida nesta primeira rodada através do ciclo do TCA é originada dos carbonos da acetil-CoA, pois são derivados a partir da extremidade oxaloacetato da molécula de citrato. Ambos os carbonos originados a partir da acetil-CoA permanecem nos intermediários do ciclo do TCA e podem aparecer em compostos produzidos nas reações biossintéticas derivadas do ciclo do TCA, incluindo a glicose, o ácido aspártico e o heme. No entanto, por causa da perda de duas moléculas de CO_2 neste ponto, não existe síntese líquida destes metabólitos a partir da acetil-CoA.

Os animais não podem realizar a síntese líquida de glicose a partir da acetil-CoA. Este é um conceito especialmente importante na compreensão da inanição, diabetes e cetogênese, pois quantidades grandes de acetil-CoA são geradas a partir dos ácidos graxos, mas não rendem uma síntese líquida de glicose. A "síntese líquida" é equivocada, pois foi claramente mostrado que os carbonos da acetil-CoA marcados são eventualmente incorporados na glicose, fazendo parecer que a glicose é sintetizada a partir da acetil-CoA. Entretanto, o investimento de dois carbonos da acetil-CoA é dissipado pelas duas reações de descarboxilação no ciclo do TCA. A síntese líquida também significa que, de forma a possibilitar a operação contínua do ciclo do TCA para a gliconeogênese e biossíntese de metabólitos, as reações anapleróticas devem fornecer

carbonos ao ciclo sob formas diferentes da acetil-CoA (ver a seguir).

Succinil-CoA sintetase

A succinil-CoA sintetase (succinato tiocinase) catalisa a conversão da succinil-CoA rica em energia em succinato e CoA livre. A energia livre da ligação tioéster na succinil-CoA é conservada pela formação do GTP a partir do GDP e fosfato inorgânico (Pi). Como um tioéster de alta energia serve como força impulsionadora para a síntese de GTP, essa é uma reação de fosforilação em nível de substrato, como as reações catalisadas pela fosfoglicerato cinase e piruvato cinase na glicólise (Cap. 12). O GTP é usado por enzimas como a fosfoenolpiruvato carboxicinase (PEPCK) na gliconeogênese (Cap. 13) e em vários passos na síntese de proteínas (Cap. 34) e na sinalização celular (Cap. 13), mas é também facilmente convertido em ATP pela enzima nucleosídio difosfato cinase:



Quadro clínico

Deficiências no metabolismo do piruvato no ciclo do TCA

Uma criança de 7 meses mostrava deterioração neurológica progressiva caracterizada pela perda da coordenação e do tônus muscular. Ela era incapaz de manter sua cabeça na posição vertical e tinha grande dificuldade de movimentar seus membros, que eram moles. Ela também sofria de acidose contínua. A administração de tiamina não fazia efeito. As dosagens mostraram que a criança tinha níveis sanguíneos elevados de lactato, α-cetoglutarato e aminoácidos de cadeias ramificadas. A criança morreu uma semana depois. O fígado, o cérebro, os rins, os músculos esqueléticos e o coração foram examinados após o óbito e todas as enzimas gliconeogênicas se mostravam com atividades normais, mas tanto a piruvato desidrogenase quanto a α-cetoglutarato desidrogenase eram deficientes. O componente defeituoso era a di-hidrolipoil desidrogenase (E_3), a qual é um produto de um único gene necessário para todas as α-cetoácido desidrogenases.

Comentário

Este é um exemplo de uma das muitas variantes da **doença de Leigh,** que é um grupo de distúrbios caracterizados pela acidose lática. O ácido lático acumula sob condições anaeróbicas ou devido a um defeito enzimático na via a partir do piruvato para a síntese do ATP. Neste caso, existem defeitos no complexo piruvato desidrogenase e no complexo α-cetoglutarato desidrogenase, bem como em outros complexos de α-cetoácidos desidrogenases, necessários para o catabolismo dos aminoácidos de cadeias ramificadas. A falha no metabolismo aeróbico leva ao aumento dos níveis sanguíneos de lactato, α-cetoglutarato e aminoácidos de cadeias ramificadas. Os tecidos que dependem do metabolismo aeróbico, tais como o cérebro e os músculos, são os mais gravemente afetados, e o quadro clínico inclui funções motoras debilitadas, distúrbios neurológicos e retardo mental. Estas doenças são raras, mas as deficiências na

priruvato carboxilase e em todos os componentes do complexo piruvato desidrogenase (CPD) têm sido descritas, incluindo as cinases e fosfatases associadas (Fig. 14.12).

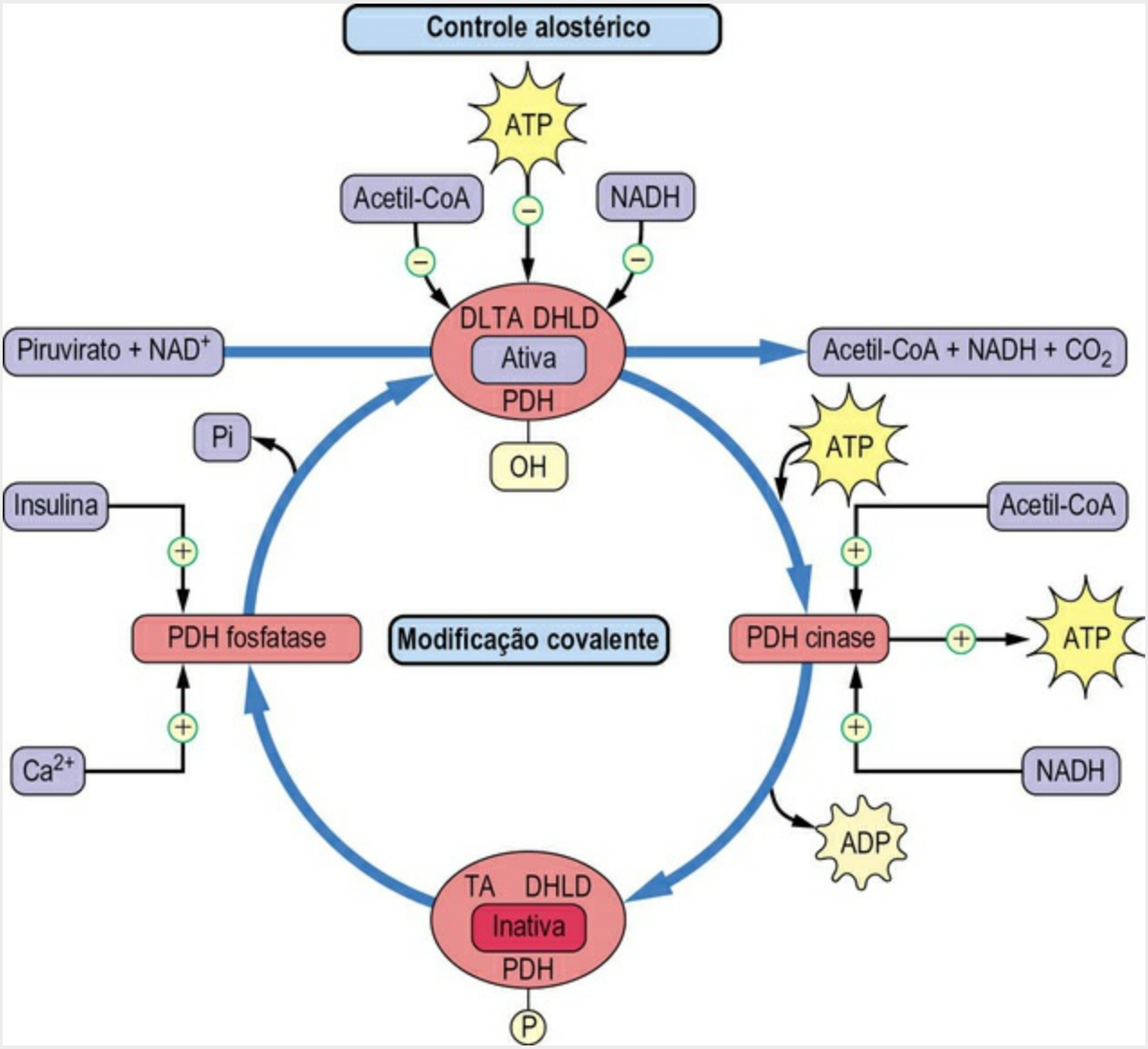


FIG. 14.12 A regulação do complexo piruvato desidrogenase.
O complexo piruvato desidrogenase regula o fluxo de piruvato no ciclo do TCA. NAD(H), ATP e acetil-CoA exercem controle tanto alostérico quanto covalente sobre a atividade da enzima. CPD, piruvato desidrogenase; TA, di-hidrolipoil transacetilase; DHLD, subunidade di-hidrolipoamida desidrogenase.

$$GTP + ADP \rightleftarrows GDP + ATP$$

As três reações seguintes no ciclo do TCA ilustram uma sequência comum no metabolismo para a introdução de um grupo carbonil em uma molécula:

- Introdução de uma dupla ligação.
- Adição de água na ligação dupla para formar um álcool.

■ Oxidação do álcool em uma cetona.

Esta mesma sequência ocorre na forma de intermediários ligados à enzima durante a oxidação dos ácidos graxos (Cap. 15).

Succinato desidrogenase

A succinato desidrogenase é uma flavoproteína contendo o grupo prostético FAD. Como descrito no Capítulo 9, esta enzima está embebida na membrana mitocondrial interna onde faz parte do complexo II (succinato-Q redutase). A reação envolve a oxidação do succinato a um ácido *trans*-dicarboxílico, o fumarato, com redução de FAD em FADH2.

Fumarase

A fumarase adiciona estereoespecificamente água na ligação dupla *trans* do fumarato para formar um α-hidroxiácido, o L-malato.

Malato desidrogenase

A malato desidrogenase catalisa a oxidação do L-malato a oxaloacetato, produzindo NADH, completando uma volta inteira pelo ciclo do TCA. O oxaloacetato pode então reagir com a acetil-CoA, continuando o ciclo de reações.

Quadro de conceitos avançados

O bloqueio do malonato

A reação da malato desidrogenase teve um importante papel na elucidação da natureza cíclica do ciclo do TCA. Era conhecido que a adição de ácidos tricarboxílicos (citrato, aconitato) e que o α-cetoglutarato catalisava o metabolismo do piruvato — hoje sabemos que isto é o resultado da formação de quantidades catalíticas de oxaloacetato a partir destes intermediários. Em 1937, Krebs observou que o malonato, o ácido dicarboxílico de três carbonos homólogos ao succinato e inibidor competitivo da succinato desidrogenase, bloqueava o metabolismo do piruvato em preparações de músculos fatiados. Ele também mostrou que a inibição do metabolismo do piruvato pelo malonato levava não só ao acúmulo do succinato, mas também do citrato e α-cetoglutarato, sugerindo que o succinato era um produto do metabolismo do piruvato e que os ácidos tricarboxílicos poderiam ser intermediários neste processo. Surpreendentemente, o fumarato e o oxaloacetato também estimularam a oxidação do piruvato e levaram ao acúmulo de citrato e succinato durante o bloqueio do malonato, sugerindo que ácidos de três e quatro carbonos poderiam se combinar para formar ácidos tricarboxílicos. Os experimentos com fumarato indicaram que existiam duas vias entre o fumarato e o succinato, uma envolvendo o reverso da reação da succinato desidrogenase, que era inibida durante o bloqueio do malonato e a outra envolvendo a conversão de fumarato a succinato através de uma série de ácidos orgânicos. Estas

observações, combinadas com a experiência de Krebs poucos anos antes na caracterização do ciclo da ureia (Cap. 19), o levaram a descrever o ciclo do TCA.

O Rendimento energético do ciclo do ácido tricarboxílico

Durante o curso do ciclo do TCA, cada mol de acetil-CoA gera coenzimas reduzidas suficientes para a síntese de cerca de 9 moles de ATP pela fosforilação oxidativa.

$$3\,\mathrm{NADH} \rightarrow 7,5\,\mathrm{ATP}$$
$$1\,\mathrm{FADH_2} \rightarrow 1,5\,\mathrm{ATP}$$

Juntamente com o GTP sintetizado pela fosforilação em nível de substrato na reação da succinil CoA sintetase (succinato tiocinase), um total de cerca de 10 equivalentes de ATP estão disponíveis por mol de acetil-CoA. Assim, o metabolismo completo de um mol de glicose, através da glicólise, do complexo piruvato desidrogenase e do ciclo do TCA, rende ≈30-32 moles de ATP (Tabela 14.1). (O rendimento real de ATP depende da via de transporte dos equivalentes redox para a mitocôndria, ou seja, cerca de 5 moles de ATP pela lançadeira malato-aspartato e cerca de 3 moles de ATP pela lançadeira do glicerol fosfato (Cap. 9). Ao contrário, somente 2 moles de ATP (líquidos) são recuperados pela glicólise anaeróbica, na qual a glicose é convertida em lactato (Cap. 12).

Tabela 14.1

Rendimento de ATP a partir da glicose durante o metabolismo oxidativo

Reação	Mecanismo	Moles ATP/mol Glc
Hexocinase	Fosforilação	–1
Fosfofrutocinase	Fosforilação	–1
G3PDH	NADH, fosforilação oxidativa	+5 (+3)*
Fosfoglicerato cinase	Fosforilação em nível de substrato	+2
Piruvato cinase	Fosforilação em nível de substrato	+2
Piruvato desidrogenase	NADH, fosforilação oxidativa	+5
Isocitrato desidrogenase	NADH, fosforilação oxidativa	+5
α-cetoglutarato desidrogenase	NADH, fosforilação oxidativa	+5
Succinil-CoA sintetase	Fosforilação em nível de substrato (GTP)	+2
Succinato desidrogenase	$FADH_2$, fosforilação oxidativa	+3
Malato desidrogenase	NADH, fosforilação oxidativa	+5
TOTAL		**32 (30)***

O rendimento de ATP é aproximado porque ele é medido experimentalmente em mitocôndrias isoladas e existe alguma variabilidade. Estudos recentes sugerem que o rendimento real de ATP a partir de NADH e $FADH_2$ é aproximadamente de 2,5 e 1,5, respectivamente, fornecendo aproximadamente 30-32 moles de ATP por mol de glicose. A oxidação da glicose em um calorímetro produz 2.870 kJ/mol (686 cal/mol), enquanto a síntese do ATP requer 31 kJ/mol (7,3 kcal/mol). O metabolismo aeróbico da glicose, portanto, tem cerca de 40% de eficiência (2.870 kJ/mol glicose/31 kJ/mol de ATP = 93 moles, teoricamente, de ATP/mol glicose; 36/93 = 39%).

*Os elétrons provenientes do NADH citosólico podem resultar na síntese de cerca de 5 moles de ATP por mol de glicose pela lançadeira malato-aspartato, mas somente 3 moles por mol de glicose pela lançadeira do glicerol 3-fosfato (Cap. 9).

Reações anapleróticas (“preenchimento”)

Conforme mostrado na Figura 14.1, muitos intermediários do ciclo do TCA participam dos processos de biossíntese, que esgotam os intermediários do ciclo do TCA. Por exemplo, a síntese de 1 mol de heme necessita de 8 moles de succinil-CoA. O ciclo do TCA poderia cessar sua função se os intermediários não fossem restabelecidos, porque a acetil-CoA não produz uma síntese líquida de oxaloacetato. As reações anapleróticas (de preenchimento) abastecem o ciclo do TCA com outros intermediários, que não acetil-CoA, para manter a atividade do ciclo. A piruvato carboxilase é um exemplo de uma enzima que catalisa uma reação anaplerótica. Ela converte o piruvato em oxaloacetato, que é necessário para a iniciação do ciclo. A enzima málica no citoplasma também converte o piruvato em malato, que pode entrar na mitocôndria como substrato para o ciclo do TCA. O aspartato é também um precursor do oxaloacetato através de uma reação de transaminação, e o α-cetoglutarato pode ser produzido através de uma reação de aminotransferase a partir do glutamato, assim como pela reação da glutamato desidrogenase. Vários outros aminoácidos “glicogênicos” (Cap. 19) podem também servir como fontes de piruvato ou de intermediários do ciclo do TCA, garantindo que o

ciclo nunca seja interrompido por falta de intermediários.

Regulação do ciclo do ácido tricarboxílico

Piruvato desidrogenase e isocitrato desidrogenase regulam a atividade do ciclo TCA

Existem vários níveis de controle do ciclo do TCA. Em geral, a atividade total do ciclo depende da disponibilidade de NAD^+ para as reações de desidrogenase. Esta, por sua vez, está ligada à taxa de consumo de NADH pelo sistema de transporte de elétrons, que depende da velocidade de utilização do ATP e da produção de ADP pelo metabolismo (Tabela 14.1). Assim, como o ATP é utilizado pelo trabalho metabólico, o ADP é produzido, o NADH é então consumido pelo sistema de transporte de elétrons para produção de ATP, e o NAD^+ é produzido. O ciclo do TCA é ativado, os combustíveis são consumidos e mais NADH é produzido e, portanto, mais ATP podem ser feitos. O nível mitocondrial de NAD^+ proporciona uma ligação entre o trabalho (utilização de ATP) e o consumo do combustível (Cap. 9).

Existem várias enzimas reguladoras que afetam a atividade do ciclo do TCA. A atividade do complexo piruvato desidrogenase e, portanto, o suprimento de acetil-CoA a partir da glicose, lactato e alanina, são regulados por modificações covalentes e alostéricas (Fig. 14.12). Os produtos da reação da piruvato desidrogenase, NADH e acetil-CoA, assim como ATP, agem como efetores alostéricos negativos do complexo enzimático. Além disso, o complexo piruvato desidrogenase está associado a cinases e fosfatases que modulam o grau de fosforilação dos resíduos de serina reguladores no complexo. NADH, acetil-CoA e ATP ativam a cinase, que fosforila e inativa o complexo enzimático. Ao contrário, quando estes três componentes estão em baixa concentração, o complexo enzimático é ativado alostericamente por desfosforilação pelas fosfatases. Este é um processo de regulação importante durante o jejum e a inanição, quando a gliconeogênese é essencial para manter a concentração de glicose no sangue. O ativo metabolismo de gorduras durante o jejum leva ao aumento de NADH e acetil-CoA na mitocôndria, que leva à inibição da piruvato desidrogenase e bloqueia a utilização de carboidrato para o metabolismo energético no fígado. Nessas condições, o piruvato, a partir de intermediários como lactato e alanina, é direcionado para a gliconeogênese. Ao contrário, a insulina estimula a piruvato desidrogenase pela ativação da fosfatase em resposta aos carboidratos da dieta. Isso direciona os carbonos derivados de carboidratos para síntese de ácidos graxos (lipogênese) via citrato sintase (Cap. 16). O Ca^{2+} também afeta a atividade de fosfatase no CPD, em resposta ao aumento do Ca^{2+} intracelular durante a contração muscular (Cap. 20).

O oxaloacetato é necessário para a entrada de acetil-CoA no ciclo do TCA, mas, às vezes, a disponibilidade do oxaloacetato parece regular a atividade do ciclo. Isso ocorre especialmente durante o jejum quando os níveis de ATP e NADH, derivados do metabolismo de gorduras, estão aumentados na mitocôndria. O aumento de NADH desloca o equilíbrio de malato:oxaloacetato na direção de malato, direcionando os intermediários do ciclo do TCA para o malato, que é exportado para o citosol para a

gliconeogênese (Cap. 13). Enquanto isso, a acetil-CoA derivada do metabolismo de gorduras é direcionada para a síntese de corpos cetônicos devido à falta de oxaloacetato, regenerando CoA-SH e levando a um aumento dos corpos cetônicos no plasma durante o jejum (Cap. 15).

A isocitrato desidrogenase é a principal enzima reguladora no ciclo do TCA. Ela está sujeita à inibição alostérica pelo ATP e NADH e à estimulação pelo ADP e NAD^+. Durante o consumo de uma dieta rica em carboidratos sob condições de repouso, a demanda por ATP está diminuída e o nível de intermediários derivados dos carboidratos aumenta. Sob estas circunstâncias, o aumento do nível de insulina estimula o complexo piruvato desidrogenase e o acúmulo de ATP, e NADH inibe a isocitrato desidrogenase, causando o acúmulo mitocondrial do citrato. O citrato é então exportado para o citosol para síntese de ácidos graxos, que são exportados do fígado para o armazenamento no tecido adiposo como triacilgliceróis. Com um aumento da demanda energética, por exemplo, durante a contração muscular, o NAD^+ e o ADP acumulam, e estimulam a isocitrato desidrogenase. A indução e a repressão, assim como a proteólise de enzimas, tais como a piruvato carboxilase e aquelas do complexo piruvato desidrogenase e do ciclo do TCA, também desempenham um papel regulador importante. De fato, todo o ciclo do TCA e as enzimas associadas são sintetizados no citoplasma e transportados através de uma complexa série de etapas para mitocôndria. A regulação pode ocorrer no nível da tradução, da transcrição e do transporte intracelular. A dieta, por exemplo, é conhecida por controlar a expressão de quatro cinases de piruvato desidrogenase; uma delas é induzida em resposta a uma dieta rica em gorduras e é reprimida em resposta a uma dieta rica em carboidratos. Infelizmente, a regulação do ciclo do TCA nos níveis genéticos e de transportes não é atualmente ainda bem conhecida, embora seja clara a sua importância para a compreensão da patogênese de vários problemas de saúde contemporâneos, tais como o diabetes e a obesidade. Três enzimas do ciclo do TCA, a succinato desidrogenase, a fumarato hidratase e a isocitrato desidrogenase, são descritas como supressores tumorais, uma vez que defeitos genéticos nessas enzimas se encontram associados a cânceres humanos (ver Cardaci e Ciriolo e Yang et al. em Leituras Sugeridas).

Resumo

- O ciclo do TCA é uma via central, comum, através da qual os combustíveis são oxidados, e também participa nas principais vias de biossíntese.
- No seu papel oxidativo, os principais produtos do ciclo do TCA são: GTP e as coenzimas reduzidas NADH e $FADH_2$, que fornecem grandes quantidades de energia livre para a síntese de ATP pela fosforilação oxidativa.
- No seu papel biossintético, o ciclo do TCA fornece intermediários essenciais para a síntese de glicose, ácidos graxos, aminoácidos e heme, assim como o ATP necessário para sua biossíntese.
- A atividade do ciclo do TCA é rigorosamente regulada pelo suprimento de substrato, por efetores alostéricos e pelo controle da expressão gênica, de tal modo que o

consumo de combustível esteja coordenado com a produção de energia.

Questões para aprendizagem

1. No beribéri, a vitamina tiamina é deficiente. Quais os intermediários que poderiam se acumular e por quê?
2. Tomando como base as taxas de consumo de oxigênio, que tecidos poderiam ser mais criticamente afetados por defeitos genéticos em enzimas do ciclo do TCA?
3. Compare a regulação do complexo piruvato desidrogenase com a regulação das enzimas citosólicas pelas reações de fosforilação e desfosforilação.
4. Avalie as consequências das deficiências nas enzimas do ciclo do TCA, tais como a succinato desidrogenase, a fumarase ou a malato desidrogenase.

Leituras sugeridas

Cardaci, S., Ciriolo, M. R. TCA cycle defects and cancer: When metabolism tunes redox state. *Int J Cell Biol*. 2012; 2012:161837.

Marin-Valencia, I., Roe, C. R., Pascual, J. M. Pyruvate carboxylase deficiency: mechanisms, mimics and anaplerosis. *Mol Genet Metab*. 2010; 101(9):9–17. [Epub 2010 Jun].

Patel, K. P., O'Brien, T. W., Subramony, S. H., et al. The spectrum of pyruvate dehydrogenase complex deficiency: clinical, biochemical and genetic features in 371 patients. *Mol Genet Metab*. 2012; 106:385–394.

Qi, F., Pradhan, R. K., Dash, R. K., et al. Detailed kinetics and regulation of mammalian 2-oxoglutarate dehydrogenase. *BMC Biochem*. 2011; 12:53.

Sudheesh, N. P., Ajith, T. A., Janardhanan, K. K., et al. Palladium alpha-lipoic acid complex formulation enhances activities of Krebs cycle dehydrogenases and respiratory complexes I–IV in the heart of aged rats. *Food Chem Toxicol*. 2009; 47:2124–2128.

Yang, M., Soga, T., Pollard, P. J., et al. The emerging role of fumarate as an oncometabolite. *Front Oncol*. 2012; 2:85.

Sites

www.johnkyrk.com/krebs.html.

www.wiley.com/legacy/college/boyer/0470003790/animations/tca/tca.htm.

www.npr.org/blogs/krulwich/2011/09/14/140428189/lord-save-me-from-the-krebs-cycle.

CAPÍTULO 15

Metabolismo Oxidativo de Lipídios no Fígado e no Músculo

John W. Baynes

Objetivos

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever o processo da ativação e do transporte dos ácidos graxos para a mitocôndria, para seu catabolismo.
- Reconhecer a sequência de reações mitocondriais envolvidas na oxidação dos ácidos graxos.
- Descrever as características gerais das vias de oxidação dos ácidos graxos insaturados, dos ácidos graxos com cadeias ímpares e daqueles com cadeia ramificada.
- Explicar as bases da via da cetogênese e identificar os principais intermediários e produtos desta via.
- Descrever o mecanismo pelo qual a ativação hormonal da lipólise no tecido adiposo é coordenado com a ativação da gliconeogênese no fígado durante o jejum.

Introdução

Normalmente as gorduras são a principal fonte de energia para o fígado e para o músculo, bem como para outros tecidos, com duas exceções: cérebro e hemácias

Os triacilgliceróis são estocados e transportados sob a forma de gordura; os ácidos graxos são a fonte imediata de energia. Os ácidos graxos são liberados das reservas de triglicerídios no tecido adiposo, transportados no plasma em associação com a albumina e entregues às células para o metabolismo. O catabolismo dos ácidos graxos ocorre inteiramente por oxidação; após terem sido transportados para dentro do citoplasma, a sua oxidação pode ocorrer tanto nos peroxissomos quanto nas mitocôndrias, principalmente por um ciclo de reações conhecido como **β-oxidação.** São liberados dois

carbonos de cada vez da extremidade carboxil terminal do ácido graxo; os principais produtos finais são a acetil-coenzima A (acetil-CoA) e as formas reduzidas dos nucleotídios, $FADH_2$ e NADH. No músculo, a acetil-CoA é metabolizada por meio do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e da fosforilação oxidativa para produzir o ATP. No fígado, a acetil-CoA é amplamente convertida em corpos cetônicos **(cetogênese),** os quais são derivados lipídicos hidrossolúveis que, como a glicose, são exportados do fígado para serem utilizados em outros tecidos. O metabolismo das gorduras é principalmente controlado pela taxa de hidrólise dos triacilglicerois (lipólise) no tecido adiposo e regulado por mecanismos hormonais envolvendo a insulina, o **glucagon, a epinefrina e o cortisol.** Estes hormônios coordenam o metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas em todo o organismo (Cap. 21).

Ativação de ácidos graxos e seu transporte para a mitocôndria

Os ácidos graxos são ativados por formação de uma ligação tioéster de alta energia com a coenzima A

Os ácidos graxos não existem livres no organismo — os sais ou ácidos graxos são sabões e dissolveriam as membranas celulares. No sangue, os ácidos graxos estão ligados à albumina, que está presente no plasma na concentração de quase 0,5 mmol/L (35 mg/mL). Cada molécula de albumina pode ligar 6-8 moléculas de ácidos graxos. No citosol, os ácidos graxos estão ligados a várias proteínas e enzimas ligadoras dos ácidos graxos e enzimas. Como passo inicial para o seu catabolismo, os ácidos graxos são ativados em seu derivado CoA, usando trifosfato de adenosina (ATP) como fonte de energia (Fig. 15.1). O grupo carboxila é primeiro ativado a um intermediário ligado à enzima, o aciladenilato de alta energia, formado pela reação do grupo carboxila do ácido graxo com o ATP. O grupo acil é então transferido para a CoA pela mesma enzima; a **acil-CoA sintetase.** Essa enzima é conhecida como ácido graxo **tiocinase,** porque o ATP é consumido na formação da ligação tioéster do acil-CoA.

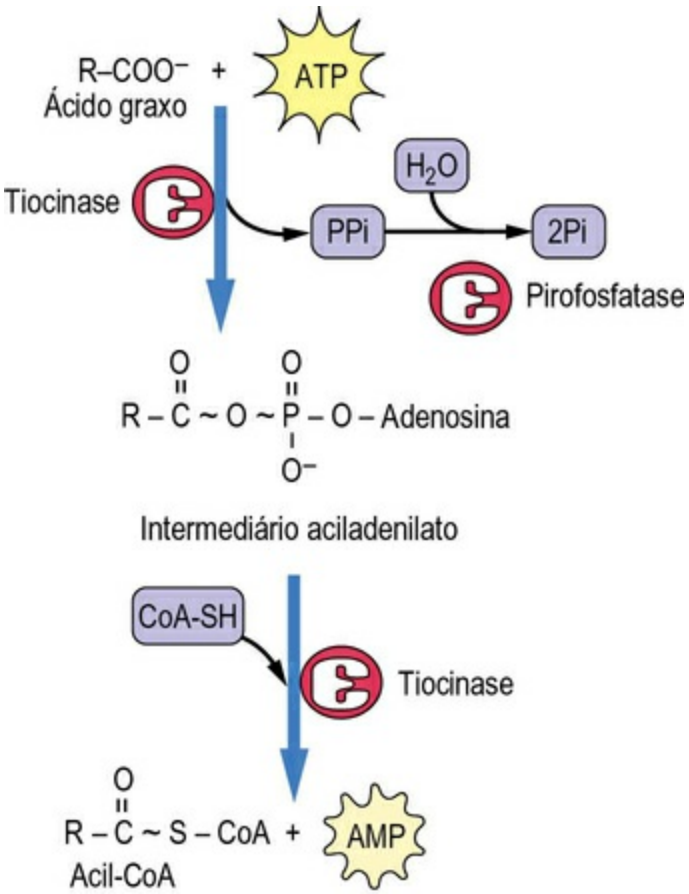


FIG. 15.1 Ativação dos ácidos graxos pela acil-CoA sintetase (tiocinase). O ATP forma um aciladenilato intermediário ligado à enzima, que é liberado pela CoA-SH para formar a acil-CoA. AMP, monofosfato de adenosina; CoA-SH, coenzima A; PPi, pirofosfato inorgânico.

O comprimento dos ácidos graxos determina onde eles serão ativados pela CoA

Os ácidos graxos de cadeia curta e de cadeia média (Tabela 15.1) podem cruzar a membrana mitocondrial por difusão passiva, sendo ativados em seus derivados CoA no interior da mitocôndria. Os ácidos graxos de cadeia muito longa provenientes da dieta são encurtados para ácidos graxos de cadeia longa nos peroxissomos. Os principais componentes dos triacilgliceróis estocados e das gorduras da dieta são os ácidos graxos de cadeia longa. Eles são ativados a derivados CoA no citoplasma e transportados para a mitocôndria pelo sistema transportador da carnitina.

Tabela 15.1

Metabolismo das quatro classes de ácidos graxos

Classe por tamanho	Número de carbonos	Local de catabolismo	Transporte pela membrana
Cadeia curta	2-4	Mitocôndria	Difusão
Cadeia média	4-12	Mitocôndria	Difusão
Cadeia longa	12-20	Mitocôndria	Ciclo da carnitina
Cadeia muito longa	>20	Peroxissomos	Desconhecido

O sistema transportador da carnitina

A lançadeira de carnitina contorna a impermeabilidade da membrana mitocondrial à coenzima A

A CoA é um derivado nucleotídio polar e grande (Fig. 14.2), por isso, não pode atravessar a membrana mitocondrial interna. Assim, para o transporte dos ácidos graxos de cadeia longa, o ácido graxo é primeiro transferido para uma molécula pequena, a carnitina, pela carnitina palmitoiltransferase-I **(CPT-I),** localizada na membrana mitocondrial externa. Um **transportador acil-carnitina** ou translocase na membrana mitocondrial interna torna possível a transferência de acil-carnitina para dentro da mitocôndria, em que a **CPT-II** regenera a acil-CoA, liberando a carnitina livre. O transporte da carnitina (Fig. 15.2) opera por um mecanismo antiporte no qual a carnitina livre e o derivado acil-carnitina movem-se em direções opostas através da membrana mitocondrial interna. Esse transporte é um ponto importante da regulação da oxidação dos ácidos graxos. Conforme discutido no próximo capítulo, o transporte da carnitina é inibido pelo **malonil-CoA,** após a ingestão de refeições ricas em carboidratos. O malonil-CoA previne o ciclo fútil em que ácidos graxos recém-sintetizados seriam oxidados na mitocôndria e promove a sua exportação do fígado para a estocagem no tecido adiposo.

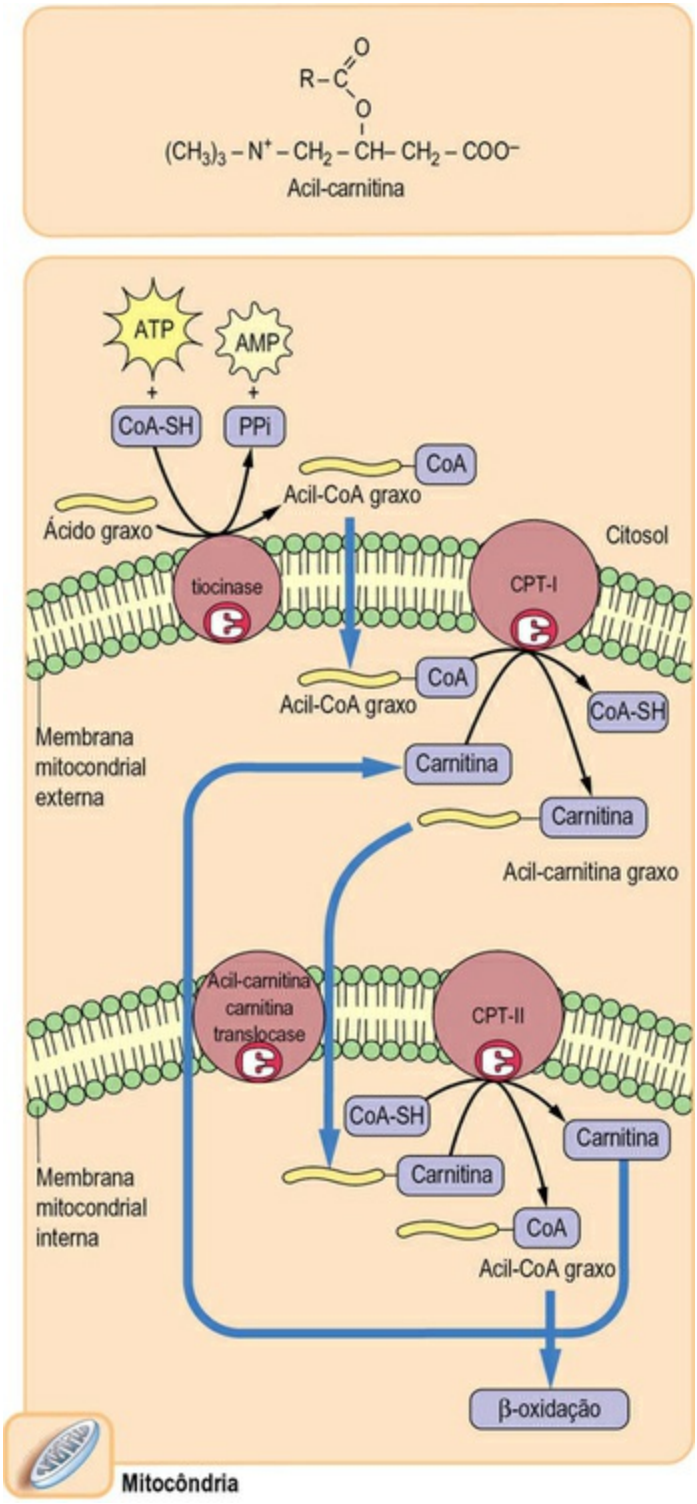


FIG. 15.2 Transporte dos ácidos graxos de cadeia longa para dentro da mitocôndria. Os três componentes da via da carnitina incluem as CPTs extra e intramitocondriais e a acil-carnitina carnitina translocase.

Oxidação de ácidos graxos

β-oxidação mitocondrial

A oxidação do carbono β (C-3) facilita a clivagem sequencial de unidades acetila da extremidade carboxila dos ácidos graxos

Os acil-CoA graxos são oxidados por um ciclo de reações que envolvem a oxidação do

carbono β para uma cetona; daí a terminologia β-oxidação (Figs. 15.3 e 15.4). A oxidação é seguida da clivagem entre os carbonos α e β por uma reação de tiolase, e não de hidrolase; desse modo, a elevada energia da ligação tioéster é preservada para fornecer a força motriz termodinâmica para reações subsequentes. Durante cada ciclo são formados um mol de acetil-CoA, $FADH_2$ e NADH, bem como um acil-CoA graxo com dois átomos de carbono a menos. Para um ácido graxo com 16 carbonos, como o palmitato, o ciclo é repetido sete vezes, produzindo 8 moles de acetil-CoA (Fig. 15.3), mais 7 moles de $FADH_2$ e 7 moles de NADH + H^+. Este processo ocorre na mitocôndria, e os nucleotídios reduzidos são utilizados diretamente para a síntese do ATP pela fosforilação oxidativa (Tabela 15.2).

Tabela 15.2

Comparação dos rendimentos energéticos da glicose e do palmitato

Substrato	Peso molecular	Rendimento líquido em ATP (mol/mol)	ATP (mol/g)	Valor calórico cal/g (KJ)
Glicose	180	36-38	0,2	4 (17)
Palmitato	256	129	0,5	9 (37)

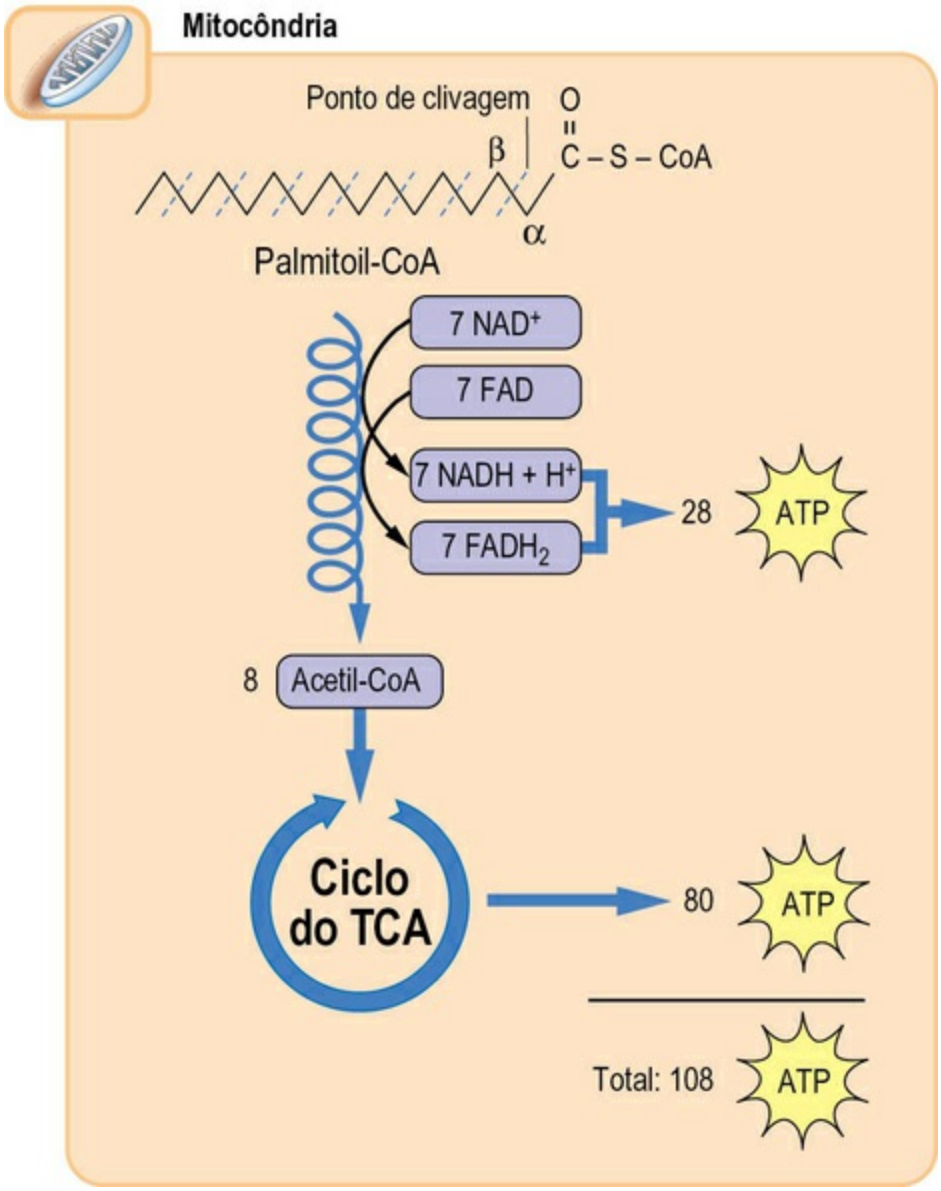


FIG. 15.3 Visão geral da β-oxidação do palmitato. Em um ciclo de reações, os carbonos da acil-CoA são liberados em unidades de dois carbonos acetil-CoA. O rendimento de 28 ATP da β-oxidação é aproximadamente equivalente à oxidação completa da glicose. No fígado, as unidades de acetil-CoA são então usadas para a síntese dos corpos cetônicos, e, em outros tecidos, são metabolizadas no ciclo do TCA para formar ATP. A oxidação completa do palmitato libera um total de 106 moles de ATP após a correção de 2 moles equivalentes ao investido na reação da tiocinase. A produção total de ATP por grama de palmitato é em torno de duas vezes à da glicose pela mesma unidade, já que a glicose é parcialmente oxidada com relação ao palmitato. Por esta razão, o valor calórico das gorduras é aproximadamente o dobro daquele dos açúcares (Tabela 15.2).

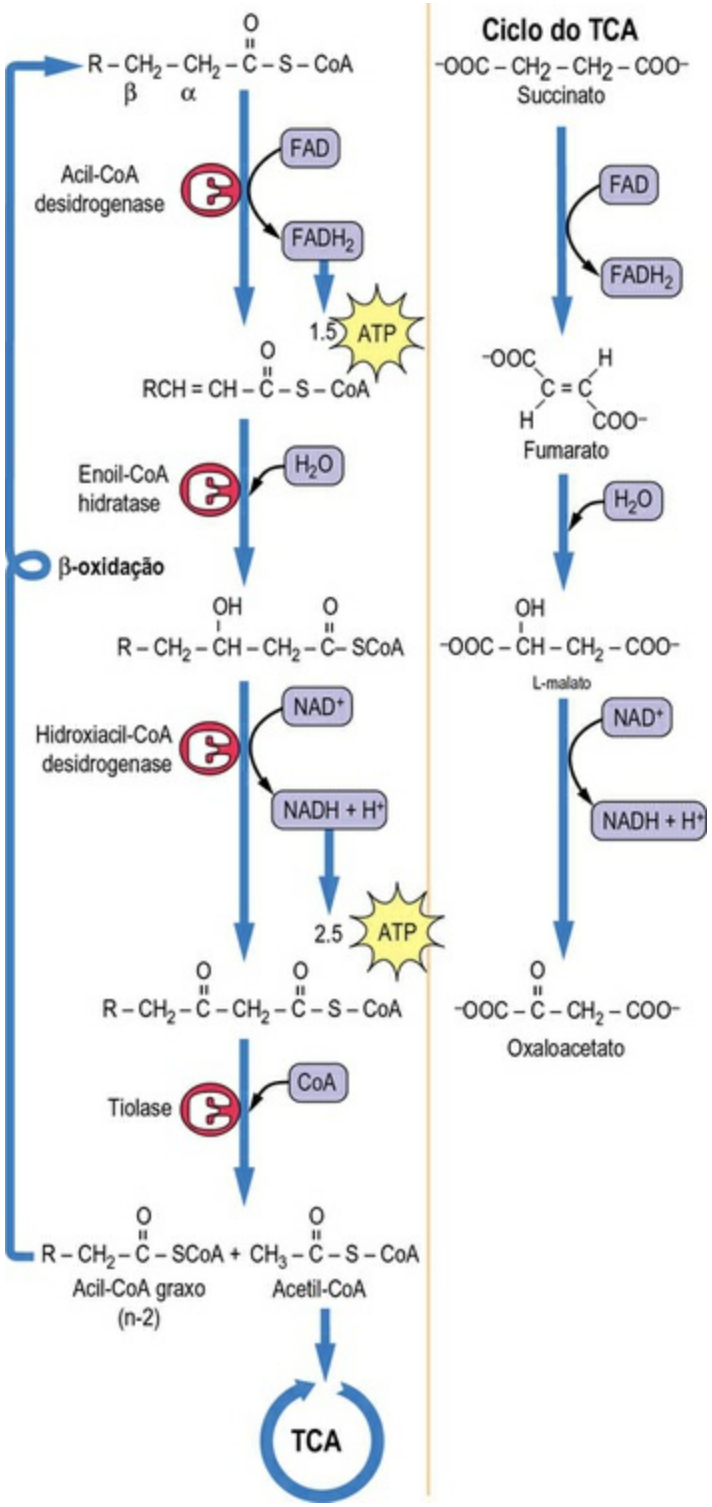


FIG. 15.4 β-oxidação dos ácidos graxos. A oxidação ocorre em uma série de etapas no carbono β para produzir um grupo ceto. A tiolase cliva o derivado resultante da β-cetoacil-CoA para originar a acetil-CoA e um ácido graxo com dois átomos de carbono a menos, que então reinicia a cascata da β-oxidação. Note a similaridade entre estas reações com aquelas do ciclo do TCA, apresentadas à direita.

As quatro etapas do ciclo da β-oxidação são apresentadas em detalhe na Figura 15.4. Note a similaridade entre a sequência destas reações e aquelas do succinato e do oxaloacetato no ciclo do TCA. Em comum com a succinato desidrogenase, a acil-CoA desidrogenase, uma proteína integral da membrana interna da mitocôndria, utiliza o grupo prostético FAD como coenzima. Mesmo a geometria *trans* do fumarato e a configuração estereoquímica do L-malato no ciclo do TCA assemelham-se aos trans-enoil-CoA e L-hidroxiacil-CoA, intermediários da β-oxidação. A última etapa do ciclo da β-

oxidação é catalisada pela tiolase, que aprisiona a energia obtida da clivagem carbono-carbono como acil-CoA, permitindo que o ciclo continue sem a necessidade de reativação do ácido graxo. O ciclo prossegue até que o ácido graxo inteiro tenha sido convertido em acetil-CoA, o intermediário comum da oxidação de carboidratos e lipídios.

Catabolismo dos ácidos graxos nos peroxissomos

Os peroxissomos são organelas subcelulares encontradas em todas as células nucleadas. Eles estão envolvidos na oxidação de um número de substratos, incluindo urato e ácidos graxos de cadeias ramificadas longa ou muito longa. Eles são o principal local da produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na célula e contabilizam cerca de 20% do oxigênio consumido nos hepatócitos. Os peroxissomos possuem sistema transportador de carnitina e conduzem a β-oxidação por via similar à da mitocôndria, exceto pelo fato de a acil-CoA desidrogenase ser uma oxidase, antes de uma desidrogenase. O montante de FADH2 produzido nesta e em outras reações de oxidação, incluindo α- e ω-oxidação, é oxidado pelo oxigênio molecular, produzindo H_2O_2. Esta via é menos eficiente energeticamente do que a β-oxidação mitocondrial onde é produzido ATP pela fosforilação oxidativa. As enzimas peroxissomais não podem oxidar ácidos graxos de cadeia curta, uma vez que produtos como a butanoil-, hexanoil- e octanoil-carnitina são exportados ou difundem-se dos peroxissomas para posterior catabolismo na mitocôndria.



Quadro clínico

Oxidação comprometida de ácidos graxos de cadeia média na deficiência em acil-CoA desidrogenase

A acil-CoA desidrogenase não é uma única enzima, mas uma família de enzimas com especificidade para a oxidação conforme o comprimento da cadeia dos ácidos graxos de cadeias curta, média e longa; os ácidos graxos são transferidos de uma enzima para outra durante as reações de encurtamento da cadeia da β-oxidação. A deficiência da acil-CoA desidrogenase de cadeia média (MCAD) é uma doença autossômica recessiva caracterizada por hipoglicemia hipocetótica. Esta se apresenta na infância e se caracteriza por altas concentrações de ácidos carboxílicos de cadeia média, acil-carnitinas e acil-glicinas no plasma e na urina. A hiperamonemia também pode estar presente como um resultado do dano hepático. As concentrações mitocondriais hepáticas dos derivados da acil-CoA de cadeia média também são aumentadas, limitando a β-oxidação e a reciclagem da CoA durante a cetogênese. A incapacidade de metabolizar as gorduras durante o jejum é uma ameaça à vida por limitar a gliconeogênese e causar hipoglicemia. A deficiência da MCAD é tratada pela alimentação frequente, evitando o jejum, e pela suplementação de carnitina. As deficiências das desidrogenases de ácidos graxos de cadeias curta e longa possuem características clínicas similares.

A **síndrome de Zellweger,** resultante de defeitos na importação de enzimas para os peroxissomos, é uma doença que atinge múltiplos órgãos e leva à morte, usualmente, por volta dos seis meses de idade; é caracterizada pelo acúmulo de ácidos graxos de cadeia longa nos tecidos neurais, muito provavelmente pela impossibilidade de metabolizar os ácidos graxos nesse tecido. Os peroxissomos também possuem funções anabólicas. Acredita-se que estes tenham papel na produção de acetil-CoA para biossíntese de colesterol e poli-isoprenoides (Cap. 17), e que contenham a di-hidroxiacetona-fosfatase aciltransferase, requerida para a síntese de plasmalogênios (Cap. 28). Os fibratos são uma classe de fármacos hipolipidêmicos que age induzindo a proliferação de peroxissomos no fígado.

Vias alternativas da oxidação dos ácidos graxos

Quando os ácidos graxos insaturados são oxidados liberam menos $FADH_2$

Os ácidos graxos insaturados já são parcialmente oxidados, assim, menos $FADH_2$ e correspondentemente menos ATP são produzidos na sua oxidação. As duplas ligações dos ácidos graxos poli-insaturados possuem uma geometria *cis* e ocorrem em intervalos de três carbonos, enquanto os intermediários da β-oxidação possuem simetria *trans* e suas reações ocorrem em etapas de dois carbonos. Dessa maneira, o metabolismo dos ácidos graxos insaturados requer várias enzimas isomerase e oxirredutase, tanto para mover a posição quanto para alterar a geometria das duplas ligações.

Os ácidos graxos de cadeia ímpar produzem succinil-CoA a partir do propionil-CoA

A oxidação dos ácidos graxos com número ímpar de carbonos ocorre a partir da carboxila terminal, da mesma maneira que a dos ácidos graxos normais, exceto o propionil-CoA, que é formada pela última clivagem da reação da tiolase. A propionil-CoA é convertida em succinil-CoA por um processo de múltiplas etapas envolvendo três enzimas e as vitaminas **biotina e cobalamina** (Fig. 15.5). A succinil-CoA entra diretamente no ciclo do TCA.

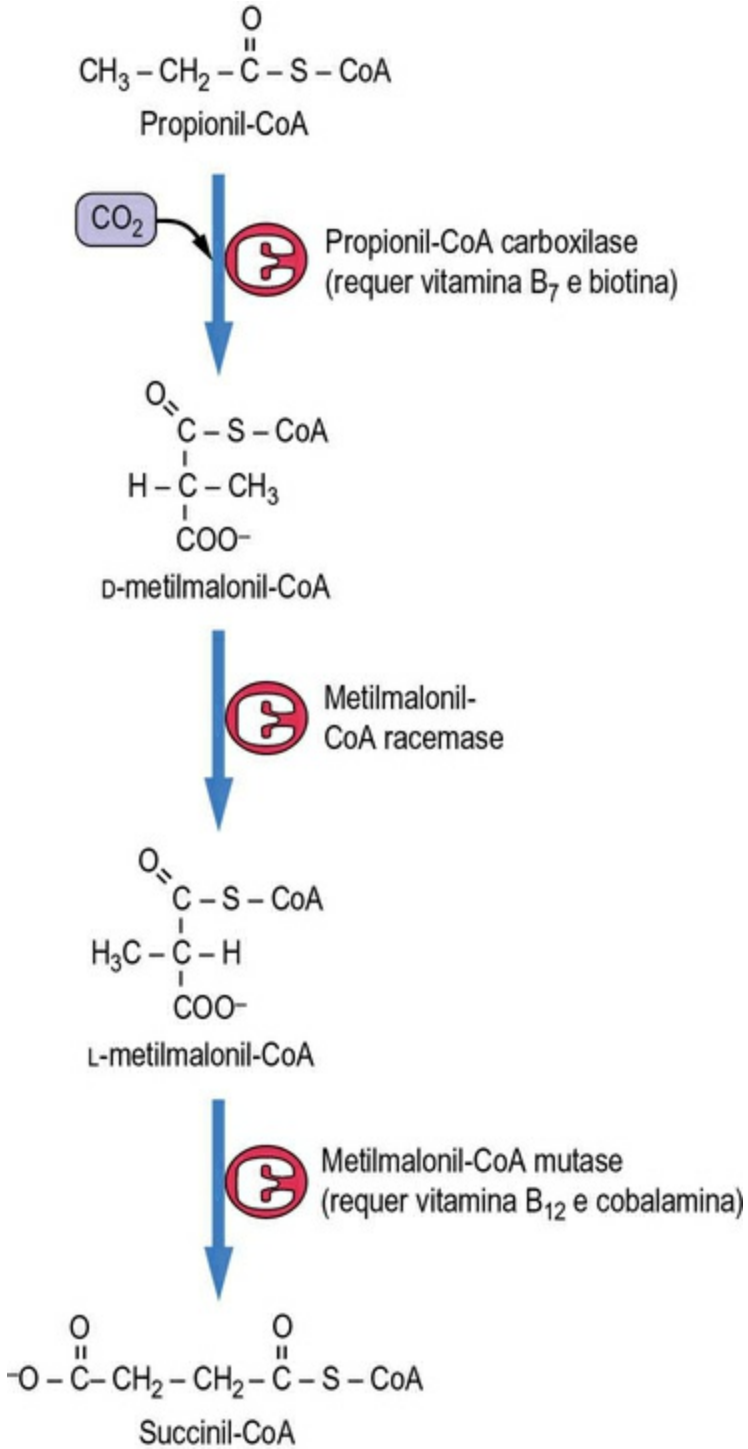


FIG. 15.5 Metabolismo do propionil-CoA para succinil-CoA. O propionil-CoA dos ácidos graxos de cadeia com número ímpar de átomos de carbono é a fonte minoritária de carbonos para a gliconeogênese. O intermediário metilmalonil-CoA também é produzido durante o catabolismo dos ácidos graxos de cadeia ramificada. Defeitos da metilmalonil-CoA mutase ou deficiência de vitamina B_{12} ocasionam a acidúria metilmalônica.

Os ácidos graxos ramificados devem ser catabolizados a acetil-CoA e propionil-CoA da α-oxidação

Ácidos fitânicos são lipídios poli-isoprenoides de cadeia ramificada encontrados na clorofila de plantas. Não é possível oxidar o carbono β do ácido fitânico para uma cetona, porque este é um ponto de ramificação. A primeira e essencial etapa no catabolismo dos ácidos fitânicos é a α-oxidação microssomal para ácido pristânico, liberando o carbono α como dióxido de carbono. Após este ponto, conforme mostrado na Figura 15.6, a acetil-

CoA e o propionil-CoA são alternativamente liberados e em igual quantidade. A doença de Refsum é uma desordem neurológica rara, caracterizada pelo acúmulo de ácido fitânico nos tecidos nervosos como resultado de um defeito genético da α-oxidação.

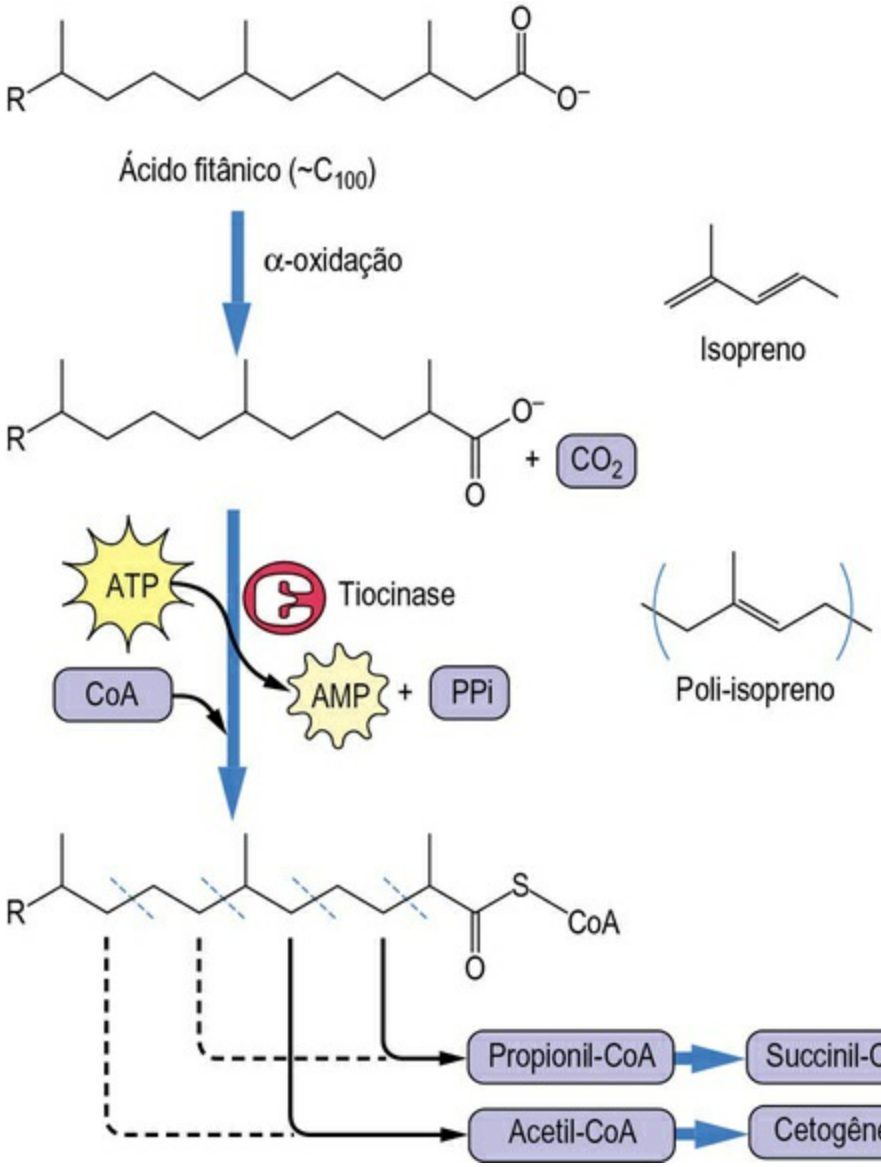


FIG. 15.6 α-oxidação dos ácidos fitânicos de cadeia ramificada. O primeiro carbono dos ácidos fitânicos é removido como dióxido de carbono. Nos ciclos subsequentes da β-oxidação, são liberados alternativamente a acetil-CoA e o propionil-CoA.

Cetogênese – uma via metabólica exclusiva do fígado

A cetogênese no jejum e na inanição

A cetogênese é uma via para regeneração da CoA a partir do excesso de acetil-CoA

O fígado utiliza os ácidos graxos como fonte de energia para a gliconeogênese durante o jejum e a inanição. As gorduras são uma fonte rica de energia e, em condições de jejum ou inanição, as concentrações de ATP e NADH derivadas das gorduras são elevadas nas mitocôndrias hepáticas, o que inibe a reação da isocitrato desidrogenase e muda o

equilíbrio oxaloacetato-malato no sentido do malato. Os intermediários do ciclo do TCA que são formados a partir dos aminoácidos liberados do músculo, como parte da resposta ao jejum e à inanição (Cap. 21), também são convertidos em malato no ciclo do TCA, e, posteriormente, o malato sai da mitocôndria para participar da gliconeogênese (Cap. 13). O baixo nível de oxaloacetato resultante na mitocôndria hepática limita a atividade do ciclo do TCA, o que leva à incapacidade de metabolizar eficientemente a acetil-CoA no ciclo do TCA. Embora o fígado possa obter energia suficiente para suportar a gliconeogênese apenas pelas enzimas da β-oxidação, que geram ambos $FADH_2$ e NADH, o acúmulo de acetil-CoA, com concomitante depleção de CoA, limita a β-oxidação.



Quadro clínico

Defeitos na β-oxidação

Acidúria Dicarboxílica e β-oxidação dos Ácidos Graxos

Vários distúrbios do catabolismo lipídico, incluindo as alterações no transporte da carnitina, deficiências na acil-CoA desidrogenase e a síndrome de Zellweger (um defeito na biogênese dos peroxissomos) estão associados ao aparecimento de ácidos dicarboxílicos de cadeia média na urina. Quando a β-oxidação dos ácidos graxos é prejudicada, estes são oxidados, um carbono por vez, pela α-oxidação ou do carbono ω pelas hidroxilases e desidrogenase microssomais dependentes de citocromo P_{450}. Estes ácidos dicarboxílicos são substratos para a β-oxidação peroxissomal, que continua até o nível de ácidos dicarboxílicos de cadeia curta, os quais são excretados do peroxissomo, aparecendo, por fim, na urina.

O que o fígado faz com o excesso de acetil-CoA que se acumula no jejum ou na inanição?

O problema de lidar com o excesso de acetil-CoA é crítico, porque o CoA está presente somente em quantidades catalíticas nos tecidos e o CoA livre é requerido para iniciar e continuar o ciclo da β-oxidação que é a primeira fonte de ATP no fígado durante a gliconeogênese. Para reciclar a acetil-CoA, o fígado utiliza uma via única conhecida como cetogênese, na qual a CoA livre é regenerada e o grupo acetato aparece no sangue sob a forma de três derivados lipídicos hidrossolúveis: **acetoacetato, β-hidroxiburiato e acetona.** A via de formação destes "corpos cetônicos" (Fig. 15.7) envolve a síntese e a decomposição da **hidroximetilglutaril (HMG)-CoA** na mitocôndria. O fígado é o único órgão que contém a HMG-CoA sintase e liase, mas é deficiente em enzimas necessárias para o metabolismo dos corpos cetônicos, o que explica a exportação deles para o sangue.

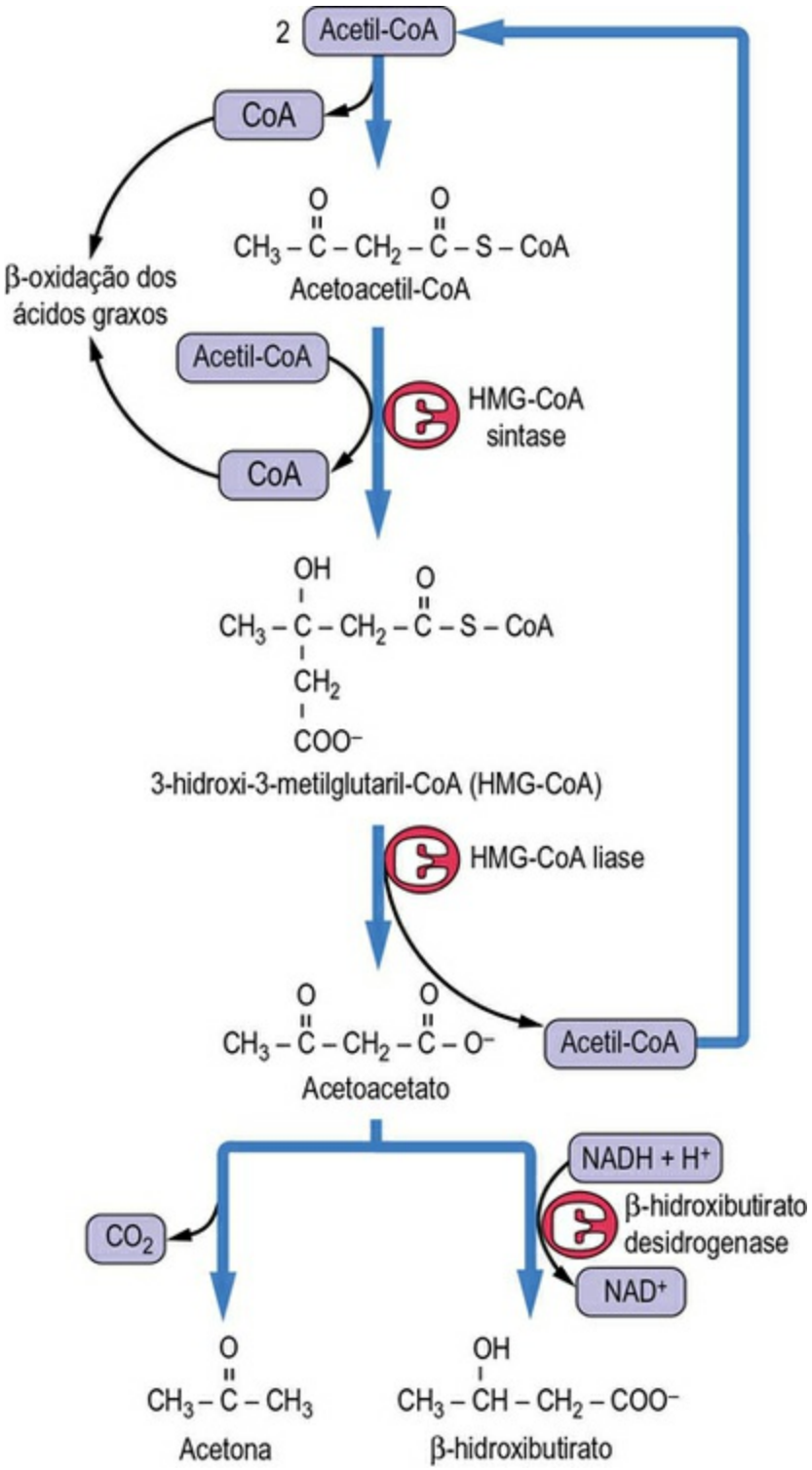


FIG. 15.7 Via da cetogênese da acetil-CoA. A cetogênese gera corpos cetônicos da acetil-coA, liberando o CoA para participar da β-oxidação. As enzimas envolvidas, a HMG-CoA sintase e a liase, são exclusivas dos hepatócitos; a HMG-CoA é um intermediário essencial. O produto inicial é o ácido acetoacético, o qual pode ser produzido enzimaticamente para β-hidroxibutirato pela β-hidroxibutirato desidrogenase, ou pode ser espontaneamente (não enzimaticamente) decomposto em acetona, que pode ser excretada na urina ou expirada pelos pulmões.

Os corpos cetônicos são distribuídos para os tecidos extra-hepáticos, incluindo o músculo esquelético e o músculo cardíaco, onde eles são convertidos em derivados da CoA para o metabolismo (Fig. 15.8). Os corpos cetônicos são uma fonte eficiente de energia (Tabela 15.3) durante o jejum e a inanição, e parecem ser utilizados nos músculos de acordo com a sua concentração plasmática. Eles são utilizados nos músculos esquelético e cardíaco proporcionalmente à sua concentração plasmática. Durante a

inanição, o cérebro também passa a fazer uso dos corpos cetônicos para obter mais de 50% de suas necessidades energéticas, poupando glicose e reduzindo a demanda da degradação das proteínas musculares para a gliconeogênese (Caps. 13 e 21).

Tabela 15.3

Concentração plasmática de ácidos graxos e corpos cetônicos em diferentes estados nutricionais

Substrato	Concentração plasmática (mmol/L)		
	Normal	Jejum	Inanição
Ácidos graxos	0,6	1,0	1,5
Acetoacetato	<0,1	0,2	1-2
β-Hidroxibutirato	<0,1	1	5-10

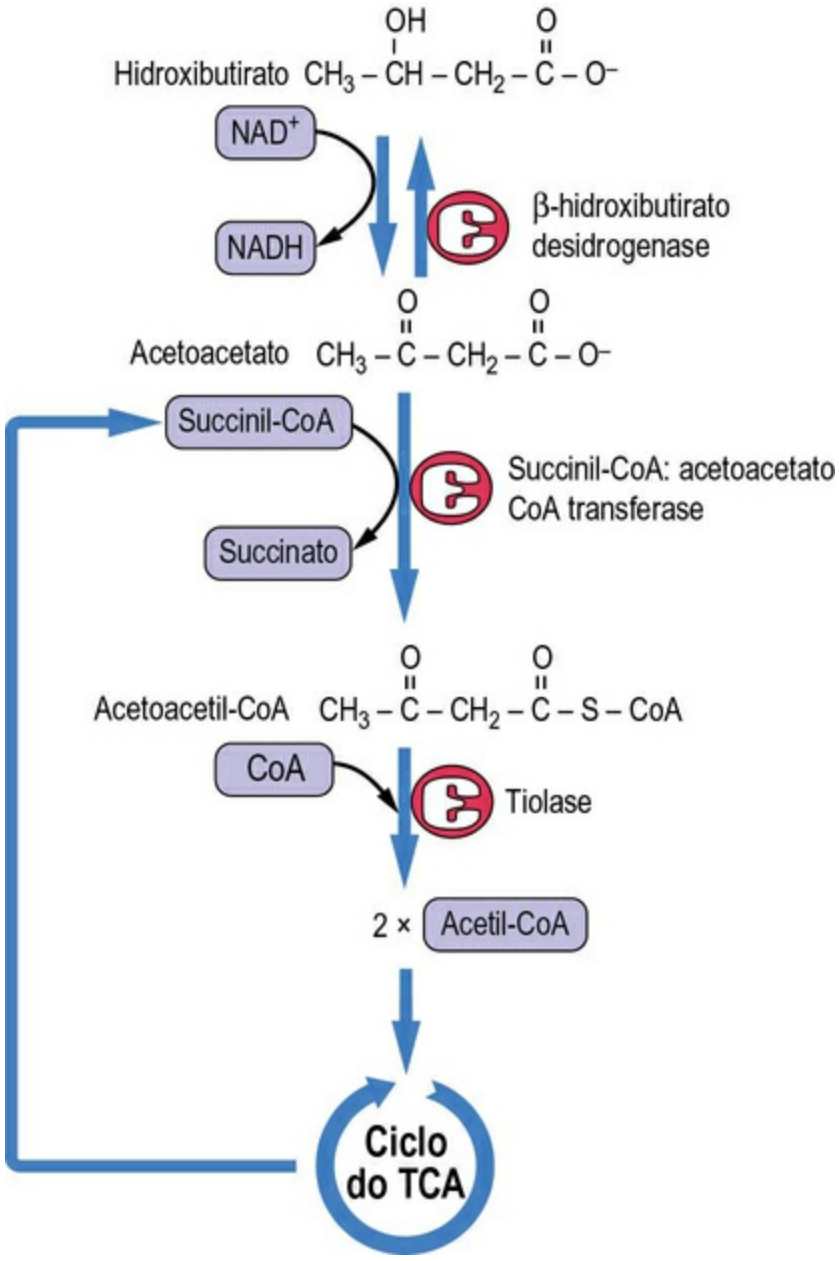


FIG. 15.8 Catabolismo dos corpos cetônicos nos tecidos periféricos. Succinil-CoA: acetoacetato-CoA transferase ativa a transferência do acetoacetato para acetoacetil-CoA. Uma enzima do tipo tiocinase também pode agir diretamente, ativando o acetoacetato em alguns tecidos.

Quadro clínico

Presença de corpos cetônicos na urina (cetonúria) e os programas de perda de peso

O aparecimento de corpos cetônicos na urina é uma indicação do metabolismo ativo de gorduras e da gliconeogênese. A cetonúria também pode ocorrer na associação de uma dieta rica em gorduras e pobre em carboidratos. Alguns programas para perda de peso encorajam a redução gradual de carboidratos e da ingestão calórica total até o aparecimento dos corpos cetônicos da urina (medido com Ketostix®). As pessoas em dieta são incitadas a manter esse nível de ingestão calórica, checando regularmente a presença de corpos cetônicos na urina para confirmar o consumo de gordura corporal.

Comentário

O Ketostix® e os testes "químicos secos" similares são tiras de testes adequadas para calcular os corpos cetônicos presentes na urina. As tiras contêm um reagente químico, tal como o nitroprussiato, que reage com o acetoacetato na urina para formar uma coloração de lavanda, graduada em uma escala com um valor máximo de " + 4" (Cap. 23 e Fig. 23.13). Uma reação " + 1" (que representa 5-10 mg de corpos cetônicos/100 mL) ou " + 2" (10-20 mg/100 mL) foi estabelecida com o objetivo de assegurar o metabolismo contínuo de gorduras e, dessa forma, a perda de peso. Atualmente esse tipo de dieta é desencorajado, pois o aparecimento de corpos cetônicos na urina indica maiores concentrações no plasma, o que pode causar acidose metabólica.

Mobilização dos lipídios durante a gliconeogênese

O metabolismo dos carboidratos e dos lipídios é regulado de forma coordenada por ação hormonal durante o ciclo alimentação-jejum

A insulina, o glucagon, a epinefrina e o cortisol controlam a direção do metabolismo do glicogênio e da glicose no fígado. Durante o jejum e a inanição, a gliconeogênese hepática é ativada pelo glucagon e requer a degradação coordenada de proteínas e a liberação de aminoácidos dos músculos, a degradação dos triacilgliceróis e a liberação de ácidos graxos do tecido adiposo. Este processo, conhecido como lipólise, é controlado pela enzima **lipase hormônio-sensível** no adipócito, que é ativada por fosforilação pela proteína cinase A dependente do cAMP em resposta ao aumento do glucagon plasmático (Caps. 13 e 21). Assim como a gliconeogênese, a lipólise é inibida pela insulina.

A ativação da lipase hormônio-sensível tem efeitos previsíveis — aumento da concentração plasmática de ácidos graxos livres, de glicerol e dos corpos cetônicos durante o jejum e a inanição (Fig. 15.9); efeitos similares são observados em resposta à epinefrina durante o estresse. A epinefrina ativa tanto a glicogenólise no fígado quanto a lipólise no tecido adiposo, dessa forma, ambos os combustíveis — glicose e ácidos graxos — estarão elevados durante o estresse. O cortisol exerce um efeito crônico sobre a lipólise e também causa resistência à insulina. A síndrome de Cushing (Cap. 39), na qual há alta concentração de cortisol no sangue, é caracterizada por hiperglicemia, perda muscular e redistribuição das gorduras dos depósitos adiposos sensíveis ao glucagon para áreas atípicas como bochechas, parte superior das costas e tronco.

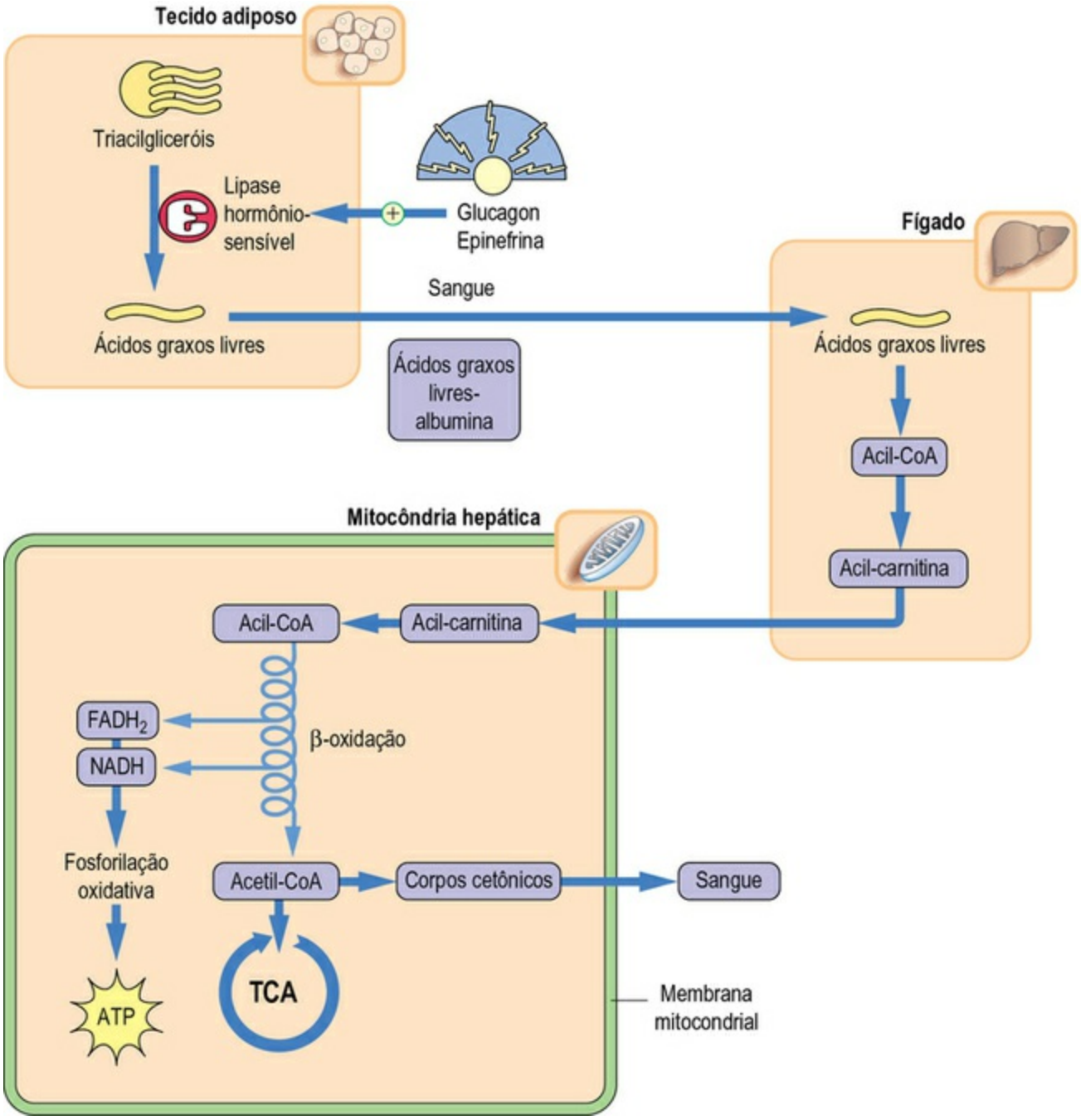


FIG. 15.9 Regulação do metabolismo dos lipídios pelo glucagon e epinefrina. O glucagon e a epinefrina ativam a lipase hormônio-sensível no tecido adiposo, em coordenação com a ativação da proteólise nos músculos e a gliconeogênese no fígado. O metabolismo dos ácidos graxos pela β-oxidação no fígado gera ATP para a gliconeogênese. A acetil-CoA é convertida em corpos cetônicos e liberada para o sangue. Estes efeitos são revertidos pela insulina após a refeição.

Quadro clínico

Defeitos na cetogênese

A Cetogênese como Resultado de uma Deficiência no Metabolismo da Carnitina

A apresentação clínica da deficiência no metabolismo da carnitina ocorre na infância e é frequentemente uma ameaça à vida. As características marcantes incluem a

hipoglicemia hipocetótica, hiperamonemia e concentração alterada da carnitina livre no plasma. São comuns danos hepáticos, miocardiopatia e fraqueza muscular.

Comentário

A carnitina é sintetizada a partir da lisina e do α-cetoglutamato, principalmente no fígado e nos rins, estando normalmente presente no plasma em uma concentração de cerca de 50 μmol/L (8 mg/dL). Existem sistemas de alta afinidade para captar a carnitina na maioria dos tecidos, incluindo os rins, que reabsorvem a carnitina do filtrado glomerular, limitando a sua excreção na urina. Deficiências homozigóticas no transporte da carnitina, dos CPTs-I e II e da translocase resultam em defeitos na oxidação dos ácidos graxos de cadeia longa. As concentrações plasmáticas e teciduais da carnitina diminuem a menos de 1 μmol/L na deficiência do transporte da carnitina, devido a defeitos na captação tecidual e à perda excessiva na urina. Por sua vez, na deficiência da CPT-I, a carnitina plasmática livre pode exceder 100 μmol/L (20 mg/dL). Tanto na deficiência da translocase quanto da CPT-II, a carnitina plasmática total pode ser normal, mas ocorre principalmente como ésteres acilcarnitina de ácidos graxos de cadeia longa — no primeiro caso, porque elas não podem ser transportadas para a mitocôndria e, no segundo, devido ao refluxo para fora da mitocôndria. Estas doenças são tratadas pela suplementação com carnitina e evitando-se o jejum.

Regulação da cetogênese

A cetogênese é ativada em conjunto com a gliconeogênese durante o jejum e a inanição

A cetogênese aumenta quando a lipase hormônio-sensível é ativada pelo glucagon no tecido adiposo durante o jejum e a inanição e no diabetes. Nestas condições, a concentração plasmática de ácidos graxos aumenta, e o fígado usa esses ácidos graxos para suportar a gliconeogênese. A energia deriva primariamente da β-oxidação, e o produto, a acetil-CoA, é metabolizado pela cetogênese. Por que motivo não é a acetil-CoA usada no ciclo do ácido tricarboxílico?

Durante a gliconeogênese, a ativação da cascata do cAMP pelo glucagon no fígado inibe a glicólise (Fig. 13.9), limitando o fluxo do piruvato a partir dos carboidratos. Todo o piruvato formado, maioritariamente a partir do lactato e da alanina, é convertido em oxaloacetato pela piruvato carboxilase, a qual é ativada pela acetil-CoA (Fig. 13.8). O oxaloacetato é então convertido em malato para a gliconeogênese e, dado o baixo nível de oxaloacetato, um substrato da citrato sintase, a acetil-CoA, é direcionado para a cetogênese, em vez de ser usado para o metabolismo energético no ciclo do ácido tricarboxílico. A orientação no sentido da cetogênese é controlada pela carga energética do fígado. A elevada concentração de ATP, produzida pelo metabolismo de gordura, inibe o ciclo do ácido tricarboxílico no passo da isocitrato desidrogenase (Cap. 14). Além disso, por controle respiratório (Cap. 9), elevados níveis de ATP levam a um aumento do potencial de membrana mitocondrial, o que inibe a cadeia transportadora de elétrons. O aumento da razão $NADH/NAD^+$ favorece a redução do oxaloacetato a malato, que sai da

mitocôndria para a gliconeogênese, em vez de ser consumido no ciclo do ácido tricarboxílico. Em resumo, durante a gliconeogênese, a acetil-CoA derivada do metabolismo de ácidos graxos é convertida em corpos cetônicos; ela não tem outro lugar para onde ir! O aumento dos corpos cetônicos no plasma **(cetonemia)** leva ao seu aparecimento na urina **(cetonúria).** No diabetes tipo 1, a elevada taxa de cetogênese pode causar cetonemia excessiva e, possivelmente, **cetoacidose** diabética, que ameaça a sobrevivência (Cap. 21).



Quadro clínico

Síndrome HELLP e APFL em mães de crianças nascidas com LCHAD (incidência de 1 em 200.000)

A deficiência da L-3-hidroxiacil-CoA desidrogenase de cadeia longa (LCHAD) pode se apresentar de várias formas. Os acometidos têm tendência a episódios de hipoglicemia não cetótica, mas podem desenvolver insuficiência hepática fulminante, miocardiopatia, rabdomiólise e, ocasionalmente, neuropatia e retinopatia. Como nas deficiências de MCAD, o tratamento envolve evitar o jejum e uma dieta enriquecida de ácidos graxos de cadeia média.

Talvez a característica mais marcante deste defeito raro no metabolismo dos ácidos graxos seja sua associação à HELLP (do inglês **h**aemolysis, **e**levated **l**iver enzimes and **l**ow **p**latelets — hemólise, enzimas hepáticas elevadas e plaquetas baixas) e a AFLP (do inglês, **a**cute **f**atty **l**iver of **p**regnancy — fígado gorduroso agudo da gravidez) maternas. Estas emergências obstétricas potencialmente fatais podem ocorrer nas mães que são heterozigotas para LCHAD, especialmente se a criança tem LCHAD. Estas síndromes também estão associadas a outro defeito recessivo do metabolismo dos ácidos graxos, a deficiência da carnitina palmitoil transferase-I.

Questões para aprendizagem

1. Compare o metabolismo da acetil-CoA no fígado e no músculo. Explique por que o fígado produz corpos cetônicos durante a gliconeogênese. O que evita a oxidação hepática da acetil-CoA?
2. Reveja os méritos do uso da carnitina como um ativador do desempenho durante o exercício e como um suplemento para pacientes geriátricos.
3. Reveja o uso atual e o mecanismo da ação de fármacos proliferadores de peroxissomos para o tratamento da dislipidemia e do diabetes.
4. Compare os mecanismos subjacentes à hiperglicemia cetoacidótica e à hipoglicemia não cetótica.

Resumo

■ Ao contrário dos combustíveis carboidratos, que entram no corpo principalmente

como glicose ou como açúcares que são rapidamente convertidos em glicose, os combustíveis lipídicos são heterogêneos em relação ao comprimento da cadeia, ramificações e insaturações.

- O catabolismo das gorduras é principalmente um processo mitocondrial, mas também ocorre nos peroxissomos.
- Utilizando uma variedade de processos de transporte específicos para o comprimento da cadeia e enzimas catabólicas, a via principal do catabolismo dos ácidos graxos envolve sua degradação oxidativa em unidades de dois carbonos — no processo conhecido como β-oxidação, que produz acetil-CoA.
- Em muitos tecidos, as unidades de acetil-CoA são utilizadas para a produção de ATP na mitocôndria.
- No fígado, a acetil-CoA é catabolizada em corpos cetônicos, principalmente o acetoacetato e o β-hidroxibutirato, por uma via mitocondrial chamada termogênese. Os corpos cetônicos são exportados do fígado para o metabolismo energético nos tecidos periféricos.
- A cetonemia e a cetonúria se desenvolvem gradualmente durante o jejum, enquanto a cetoacidose pode desenvolver-se durante o diabetes mal controlado, quando o metabolismo de gordura se encontra aumentado para níveis elevados no sentido de suportar a gliconeogênese.

Leituras sugeridas

Cahill, G. F., Jr. Fuel metabolism in starvation. *Annu Rev Nutr*. 2006; 26:1–22.

Islinger, M., Grille, S., Fahimi, H. D., et al. The peroxisome: an update on mysteries. *Histochem Cell Biol*. 2012; 137:547–574.

Kossoff, E. H., Hartman, A. L. Ketogenic diets: new advances for metabolism-based therapies. *Curr Opin Neurol*. 2012; 25:173–178.

Longo, N., Amat di San Filippo, C., Pasquali, M. Disorders of carnitine transport and the carnitine cycle. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2006; 142:77–85.

McPherson, P. A., McEneny, J. The biochemistry of ketogenesis and its role in weight management, neurological disease and oxidative stress. *J Physiol Biochem*. 2012; 68:141–151.

Rector, R. S., Ibdah, J. A. Fatty acid oxidation disorders: maternal health and neonatal outcomes. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2010; 15:122–128.

Sass, J. O. Inborn errors of ketogenesis and ketone body utilization. *J Inherit Metab Dis*. 2012; 35:23–28.

Solis, J. O., Singh, R. H. Management of fatty acid oxidation disorders: a survey of current treatment strategies. *J Am Diet Assoc*. 2002; 102:1800–1803.

Stojanovic, V., Ihle, S. Role of beta-hydroxybutyric acid in diabetic ketoacidosis: a review. *Can Vet J*. 2011; 52:426–430.

Wanders, R. J., Waterham, H. R. Peroxisomal disorders: the single peroxisomal enzyme deficiencies. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1763:1707–1720.

Wanders, R. J., Ferdinandusse, S., Brites, P., et al. Peroxisomes, lipid metabolism and lipotoxicity. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1801:272–280.

Wilcken, B. Fatty acid oxidation disorders: outcome and long-term prognosis. *J Inherit Metab Dis*. 2010; 33:501–506.

Wolfsdorf, J., Craig, M. E., Daneman, D., et al. Diabetic ketoacidosis in children and adolescents with diabetes. *Pediatr Diabetes*. 2009; 10(Suppl 12):118–133.

Sites

Carnitine: http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/othernuts/carnitine/
Lipids OnLine - slide library:www.lipidsonline.org/slides/
Peroxisomal disorders:www.emedicine.com/neuro/topic309.htm

CAPÍTULO 16

Biossíntese e Armazenamento de Ácidos Graxos

Fredrik Karpe and John I. Broom

Objetivos

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever a via de síntese de ácido graxo, em particular os papéis da acetil-CoA carboxilase e da enzima multifuncional ácido graxo sintase.
- Descrever a regulação de curto e longo prazos da síntese de ácido graxo.
- Explicar os conceitos de alongamento e dessaturação da cadeia de ácido graxo.
- Descrever a síntese de triglicerídios.
- Debater sobre a função endócrina do tecido adiposo.

Introdução

A maioria dos ácidos graxos necessários aos seres humanos é fornecida na alimentação; contudo, a via para a sua síntese *de novo* (lipogênese) a partir de compostos de dois carbonos está presente em muitos tecidos, como fígado, cérebro, rim, glândulas mamárias e tecido adiposo. Está também muito ativa em alguns cânceres. Em geral, a via de síntese *de novo* se encontra ativa principalmente em situações de excesso de consumo energético, em particular na forma de excesso de carboidratos. Nesta situação, os carboidratos, e em menor extensão precursores aminoácidos, são convertidos em ácidos graxos no fígado e armazenados como triacilgliceróis (TAG, também conhecidos como triglicerídios) em gotículas lipídicas celulares. Isso pode acontecer em muitos tipos celulares, mas os adipócitos (e o tecido adiposo) se dedicam ao armazenamento de grandes quantidades de TAG. Em seres humanos, o tecido adiposo pode não ser quantitativamente o local mais importante para a síntese de ácidos graxos: o principal órgão lipogênico é o fígado.

A via para a lipogênese não é simplesmente o reverso da oxidação de ácidos graxos (Cap. 15). A lipogênese requer um conjunto de enzimas completamente diferente e se localiza em um compartimento celular diferente, o citosol. Além disso, ela utiliza a nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato reduzida (NADPH) como fonte de poder redutor, e não a nicotinamida adenina dinucleotídio (NAD+) necessária na β-oxidação.

As proteínas de ligação a um elemento regulador de esterol-1 (principalmente a SREBP 1c; também SREBP1a) providenciam a regulação primordial da lipogênese *de novo* por controle transcricional. A SREBP é uma proteína ligada ao retículo endoplasmático e sensora de membrana que sofre quebra proteolítica, permitindo seu transporte para o núcleo. No núcleo, a SREBP se liga a sequências específicas de DNA (os elementos reguladores de esterol ou SREs) localizadas nas regiões de controle dos genes que codificam enzimas necessárias à lipogênese.

Síntese de ácido graxo

Ácidos graxos são sintetizados a partir de acetil-CoA

A síntese de ácidos graxos nos sistemas de mamíferos pode ser considerada um processo com dois estágios, ambos dependentes de unidades de acetil-CoA e ambos empregando proteínas multifuncionais em complexos multienzimáticos.

- Estágio 1: formação do precursor-chave malonil-CoA a partir de acetil-CoA pela acetil-CoA carboxilase.
- Estágio 2: alongamento da cadeia de ácido graxo em incrementos de dois carbonos pela ácido graxo sintase.

O estágio preparatório: acetil-CoA carboxilase

A carboxilação de acetil-CoA a malonil-CoA é a etapa-chave da síntese de ácido graxo

No primeiro estágio da biossíntese de ácido graxo, a acetil-CoA, derivada principalmente do metabolismo de carboidratos, é convertida em malonil-CoA pela ação da enzima acetil-CoA carboxilase (Fig. 16.1). Existem duas formas de acetil-CoA carboxilase (ACC1 e ACC2). A ACC1 está localizada no citoplasma e comprometida com a síntese de ácidos graxos, enquanto a ACC2 se encontra na mitocôndria, onde regula a oxidação de ácidos graxos (a inibição da ACC2 resulta em uma oxidação lipídica aumentada). ACC1 é uma enzima dependente de biotina com funções enzimáticas distintas e função de proteína carreadora: suas subunidades agem como uma biotina carboxilase, uma transcarboxilase e uma proteína carreadora de carboxil-biotina. Essa enzima é sintetizada na forma de um protômero inativo, cada protômero contendo todas as subunidades mencionadas anteriormente, uma molécula de biotina e um sítio alostérico regulatório para ligação do citrato (um metabólito do ciclo de Krebs) ou do palmitoil-CoA (o produto final da via de biossíntese de ácido graxo). Essa reação também se dá em estágios: inicialmente há a carboxilação da biotina, envolvendo adenosina trifosfato (ATP), seguida da transferência

desse grupo carboxila para a acetil-CoA, produzindo malonil-CoA. Nesse estágio, o complexo enzima-biotina livre é liberado.

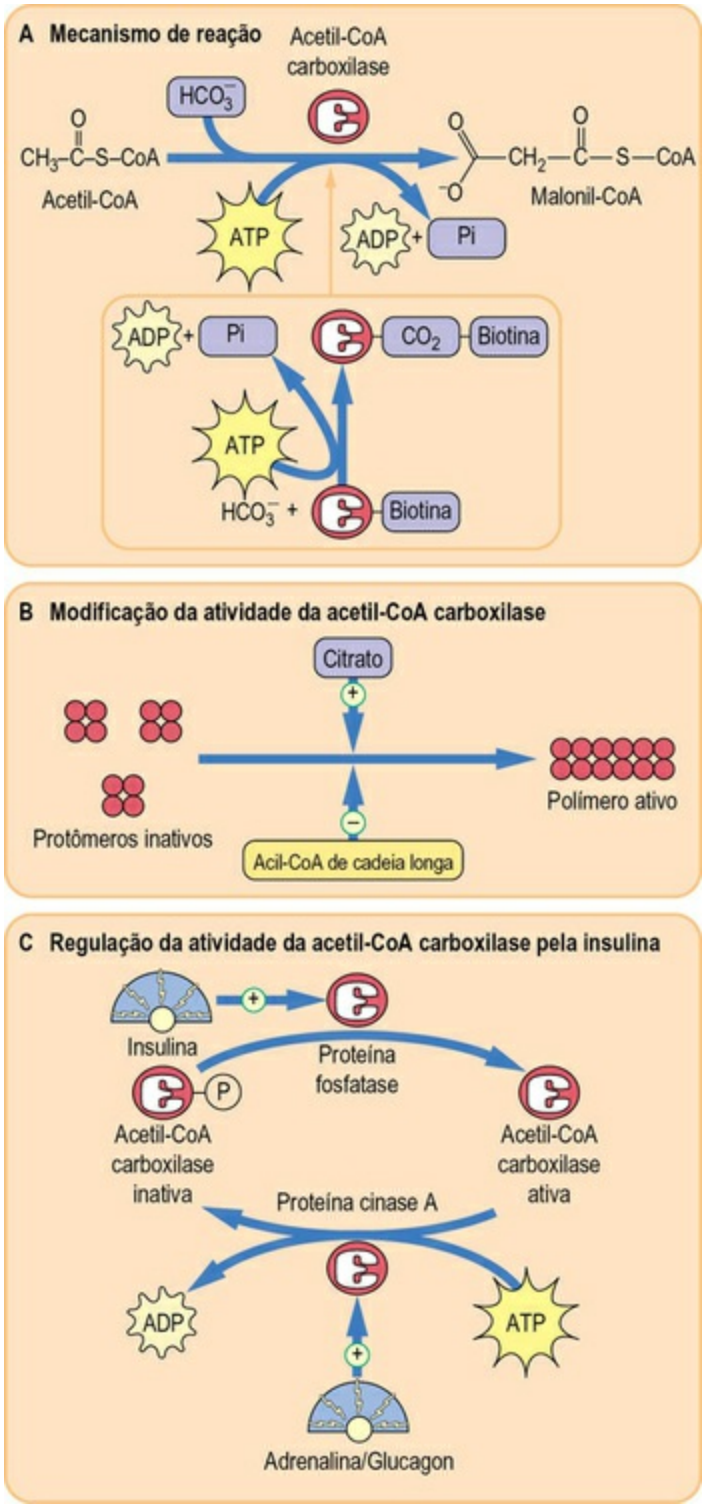


FIG. 16.1 Conversão da acetil-CoA em malonil-CoA.
(A) Reação catalisada pela acetil-CoA carboxilase. A enzima se liga covalentemente à biotina, que é carboxilada utilizando uma molécula de ATP. **(B)** A acetil-CoA carboxilase requer a presença de citrato que estimula a polimerização para a sua forma ativa. **(C)** A atividade da acetil-CoA carboxilase é regulada por um mecanismo de fosforilação/desfosforilação. Esse, por sua vez, é controlado por hormônios que regulam o metabolismo do combustível: insulina, glucagon e adrenalina.

Esse processo permite a síntese de moléculas de ácidos graxos com número par de átomos de carbono. O propionil-CoA é um substrato usado na síntese de ácidos graxos

com número ímpar de átomos de carbono, mas isso não é observado nos seres humanos.

A acetil-CoA carboxilase está sujeita a uma rigorosa regulação

Os protômeros de acetil-CoA carboxilase se polimerizam na presença de citrato ou isocitrato, produzindo a forma ativa da enzima. A polimerização é inibida pela ligação da palmitoil-CoA ao mesmo sítio alostérico. Os respectivos efeitos estimulatório e inibitório do citrato e do palmitoil-CoA são inteiramente lógicos: em condições de alta concentração de citrato, o armazenamento de energia é desejado, mas quando o palmitoil-CoA, o produto final da via, se acumula, uma diminuição na síntese de ácidos graxos é apropriada. Há um mecanismo adicional de controle, independente de citrato ou palmitoil-CoA, envolvendo a fosforilação e desfosforilação da enzima. Esse mecanismo envolve proteínas cinase/fosfatase dependentes de hormônio (Fig. 16.1). A fosforilação inibe a enzima, e a desfosforilação ativa a enzima. A fosforilação da enzima é promovida por glucagon ou adrenalina, e a desfosforilação é promovida pela insulina, que é um hormônio lipogênico. A fosforilação é também dependente da ativação da proteína cinase ativada por AMP (AMPK).

Os carboidratos da dieta e a ingestão de gordura também controlam a acetil-CoA carboxilase

A carboxilação da acetil-CoA a malonil-CoA direciona a via para a síntese de ácido graxo. É por esse motivo que essa enzima se encontra sob rigoroso controle a curto prazo. Um controle de mais longo prazo é exercido pela alimentação, através da indução ou repressão da síntese enzimática: a síntese de acetil-CoA carboxilase é aumentada em condições de ingesta de alto teor de carboidrato/baixo teor de gordura, enquanto a inanição ou uma ingesta de alto teor de gordura/baixo teor de carboidrato leva a uma diminuição na síntese dessa enzima.

Sintetizando uma cadeia de ácido graxo: ácido graxo sintase

O segundo passo importante na síntese de ácido graxo também envolve um complexo multienzimático, a ácido graxo sintase. Esse sistema enzimático é muito mais complexo que a acetil-CoA carboxilase. A proteína contém sete atividades enzimáticas distintas e uma proteína carreadora de acil (ACP). A ACP, uma proteína altamente conservada, substitui a CoA como a entidade que se liga à cadeia de ácido graxo para seu alongamento. A estrutura dessa molécula está ilustrada na Figura 16.2 e consiste em um dímero de grandes polipeptídios idênticos dispostos em direções opostas. Cada monômero possui todas as sete atividades enzimáticas e a ACP. Ele também possui um longo grupo panteteína que funciona como um "braço" flexível, permitindo que a molécula que está sendo sintetizada esteja acessível a diferentes enzimas no complexo ácido graxo sintase. A função de síntese de ácido graxo é compartilhada pelas duas cadeias polipeptídicas.

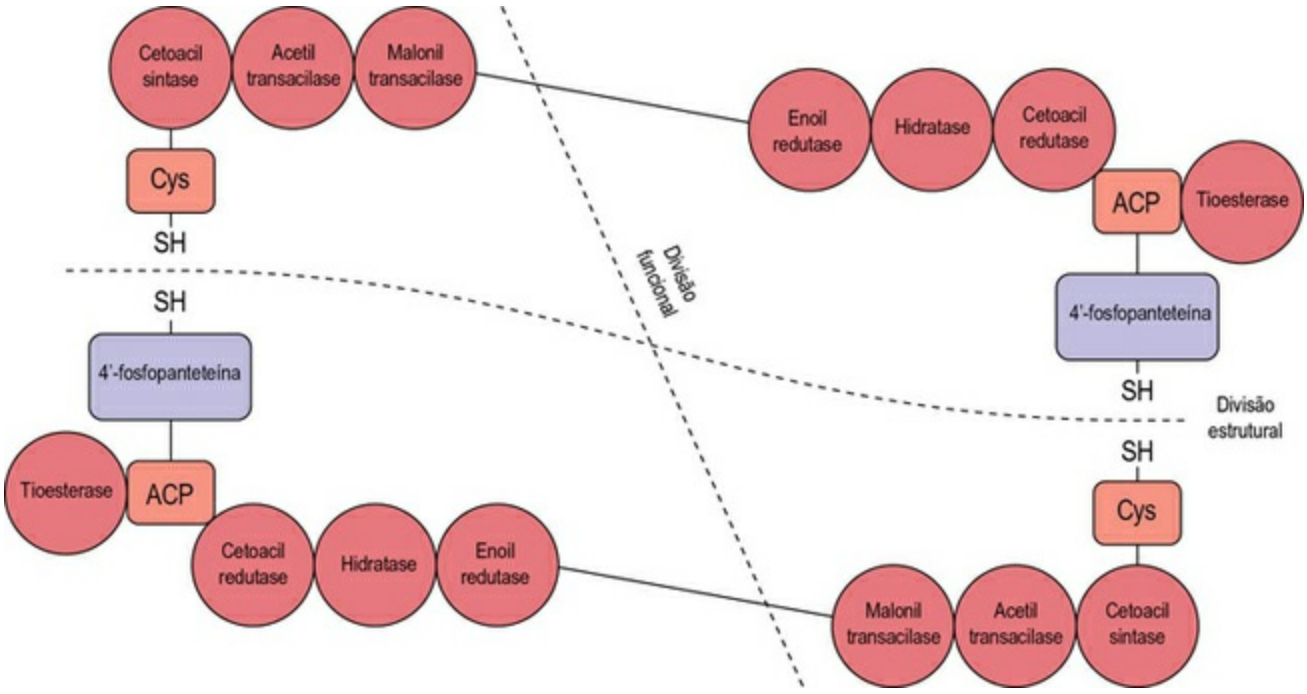


FIG. 16.2 Estrutura da ácido graxo sintase.
A ácido graxo sintase é um dímero constituído de duas subunidades grandes dispostas em direções opostas. Ela contém sete atividades enzimáticas distintas e uma proteína carreadora de acil (ACP). Cys, cisteína.

A ácido graxo sintase sintetiza a molécula de ácido graxo com até 16 carbonos de comprimento

A reação prossegue após uma ligação inicial do grupo cisteína (Cys-SH) com a acetil-CoA, uma reação catalisada pela **acetil transacilase** (Fig. 16.3). O malonil-CoA é então transferido pela **malonil transacilase** para o resíduo -SH do grupo panteteína ligado à ACP da outra subunidade. Depois, a **3-cetoacil sintase** (a enzima condensadora) catalisa a reação entre o grupo acetil previamente acoplado e o resíduo de malonil, liberando CO_2 e formando o complexo 3-cetoacil — enzima. Isso libera o resíduo de cisteína da cadeia 1 que se encontrava ocupado pela acetil-CoA. O grupo 3-cetoacil posteriormente sofre sequencialmente redução, desidratação e nova redução, formando um complexo acil-enzima saturado. A próxima molécula de malonil-CoA desloca o grupo acil do grupo pantoteína-SH para o grupo cisteína recém-liberado, e a sequência de reação é repetida por mais seis ciclos (sete ciclos no total). Uma vez que a cadeia de 16 carbonos (palmitato) é formada, o complexo acil-enzima saturado ativa a **tioesterase,** liberando a molécula de palmitato do complexo enzimático. Os dois sítios -SH estão agora livres, permitindo que um novo ciclo de síntese de palmitato seja iniciado.

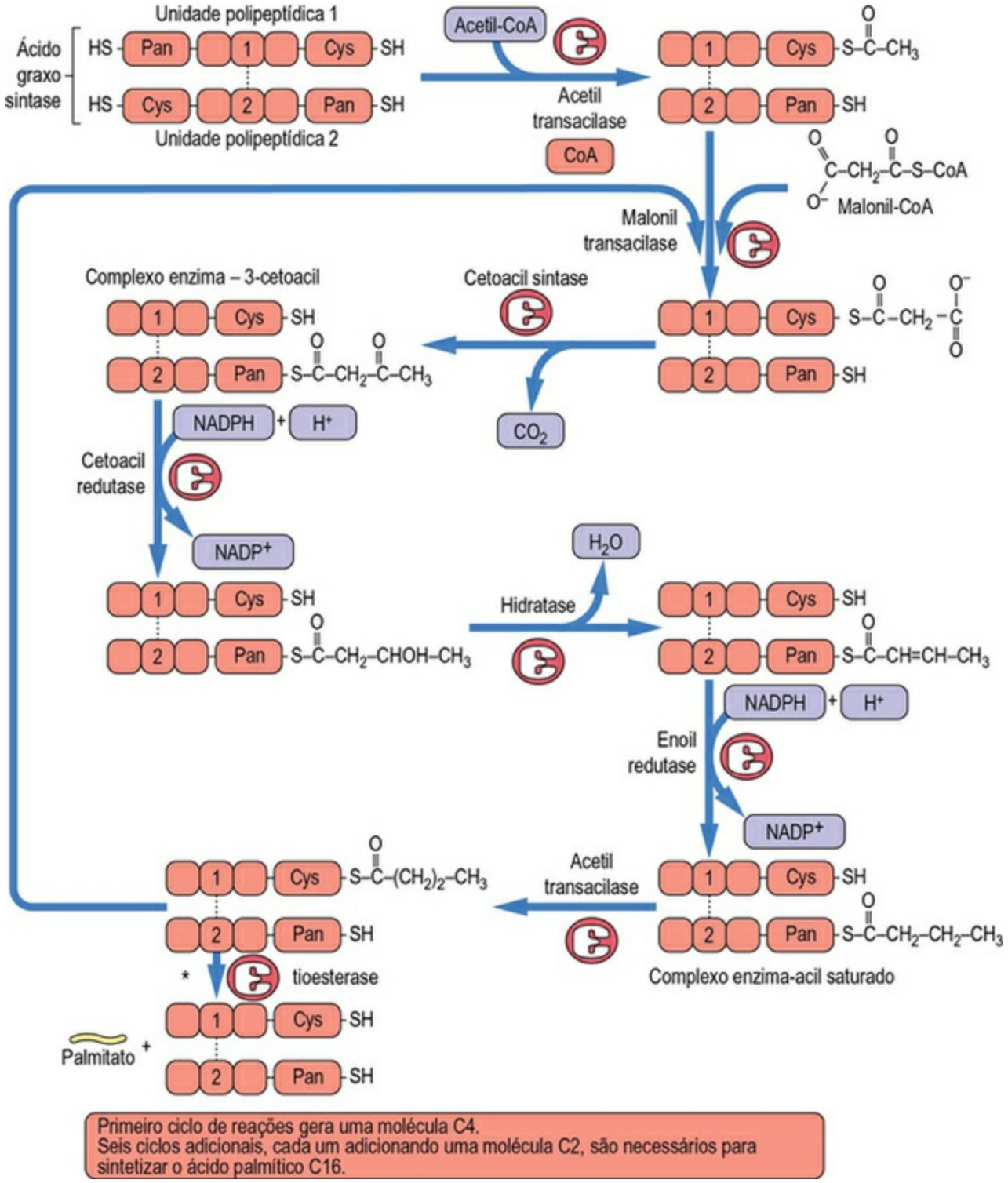


FIG. 16.3 Reações catalisadas pela ácido graxo sintase.
A síntese da cadeia de ácido graxo é iniciada por uma molécula de malonil-CoA (C3) que reage com a primeira molécula de acetil-CoA (C2); isso produz uma molécula C4 (um carbono é perdido em forma de CO_2 durante a condensação de malonil-CoA e acetil-CoA). Existem mais seis ciclos, cada um adicionando 2C à cadeia de ácido graxo (sete ciclos no total), e o resultado é uma molécula de palmitato com 16 carbonos. NADPH, nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato reduzida; Pan, panteteína.
*Essa reação ocorre uma vez que a cadeia de acil graxo de 16 carbonos esteja formada.

A síntese de uma molécula de palmitato requer 8 moléculas de acetil-CoA, 7 de ATP, 14 de NADPH e 14 H^+:

$$8Ac - CoA + 7ATP + 14NADPH + 4H^{+}$$
$$\rightarrow CH_3(CH_2)_{14}COO^{-}(\text{palmitato}) + 14NADP^{+} + 8CoA$$
$$+6H_2O + 7ADP + 7Pi + 7CO_2$$

Assim como o sistema da acetil-CoA carboxilase, a ácido graxo sintase também é regulada pela presença de açúcares fosforilados através de um efeito alostérico e também por indução e repressão da enzima.

A alteração na quantidade de enzima é exercida pelo estado nutricional

As taxas de síntese de ácido graxo são maiores quando um indivíduo segue uma dieta hipercalórica, de alto teor de carboidrato/baixo teor de gordura e são baixas durante o jejum/inanição ou em uma dieta de alto teor de gordura.

A lançadeira de malato

A lançadeira de malato permite o recrutamento de unidades de dois carbonos da mitocôndria para o citoplasma

A molécula primária necessária para a síntese de ácidos graxos é a acetil-CoA. No entanto, a acetil-CoA é gerada na mitocôndria e não consegue atravessar livremente a membrana mitocondrial interna. Como mencionado anteriormente, a biossíntese de ácido graxo ocorre no citosol. A lançadeira de malato é um mecanismo que permite a transferência de unidades de dois carbonos da mitocôndria para o citosol: ele envolve o antiporte malato-citrato (Fig. 16.4). O piruvato derivado da glicólise é descarboxilado em acetil-CoA na mitocôndria: subsequentemente ele reage com oxaloacetato no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) (Cap. 14) para formar o citrato. A translocação de uma molécula de citrato para o citosol por antiporte é acompanhada pela transferência de uma molécula de malato para a mitocôndria. No citosol, o citrato, na presença de ATP e CoA, é submetido a uma clivagem em acetil-CoA e oxaloacetato pela citrato liase. Isso disponibiliza a acetil-CoA para carboxilação em malonil-CoA e para a síntese de ácidos graxos. A síntese de ácidos graxos é também ligada ao metabolismo da glicose através da via da pentose fosfato que é a maior fornecedora de NADPH necessário à lipogênese. A frutose é especificamente canalizada através desta via e é muito lipogênica. Uma parte do NADPH é também gerada pela descarboxilação do malato a piruvato, dependente de $NADP^{+}$, pela enzima málica.

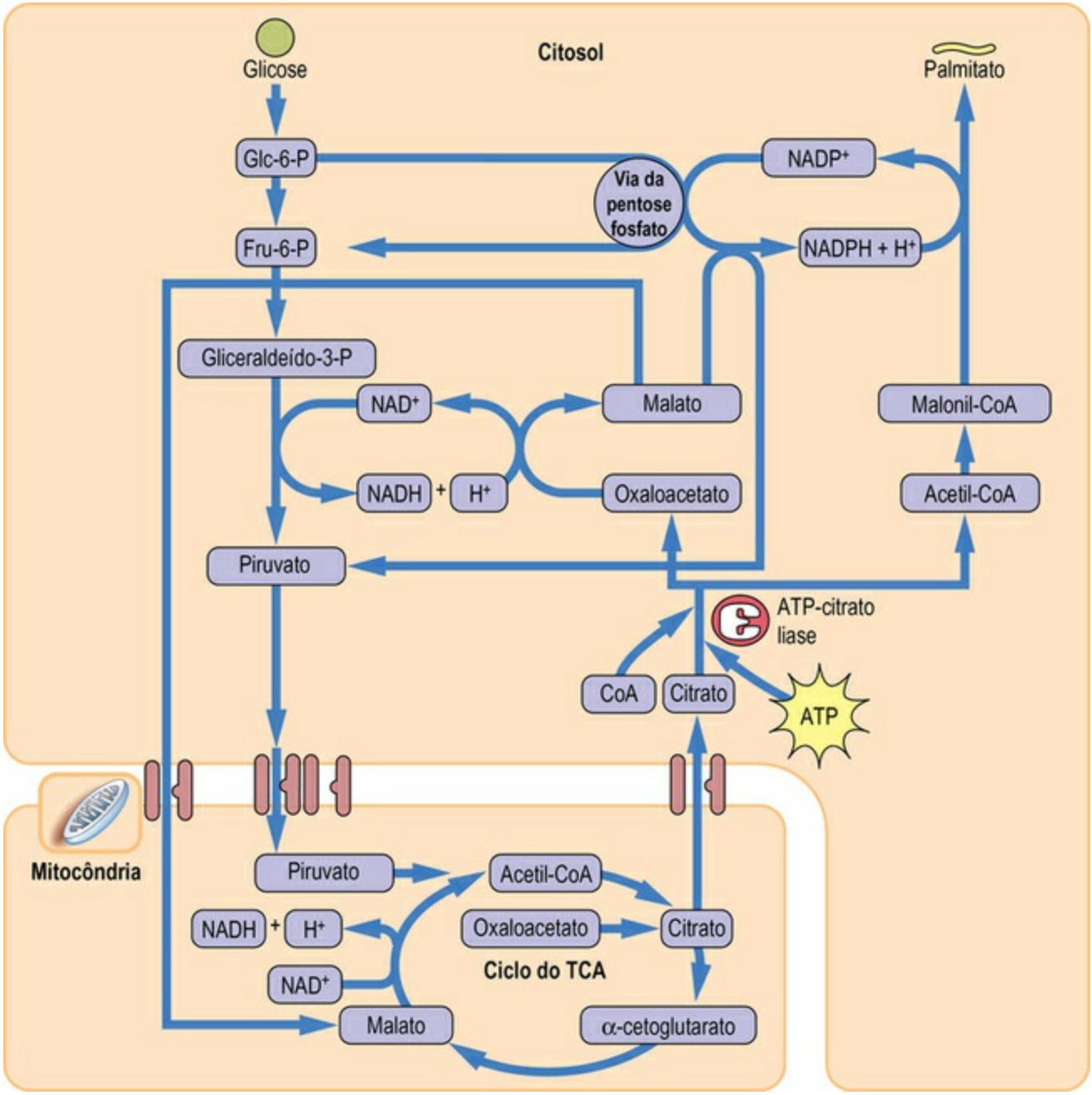


FIG. 16.4 A lançadeira de malato.
A acetil-CoA é gerada na mitocôndria e não consegue atravessar a membrana mitocondrial. A lançadeira de malato facilita o transporte das unidades de dois carbonos das mitocôndrias para o citoplasma. O citrato, sintetizado a partir da acetil-CoA e do oxaloacetato, é transportado para o exterior da mitocôndria. No citosol, é fragmentado novamente em acetil-CoA e oxaloacetato. O oxaloacetato é então convertido em malato, que retorna à mitocôndria — portanto, uma "lançadeira". A acetil-CoA é ressintetizada no citoplasma e entra na lipogênese. Fru-6-P, Frutose-6-fosfato; Glc-6-P, Glicose-6-fosfato; NADH, nicotinamida adenina dinucleotídio (reduzido). (Fig. 9.7.)

Quadro de conceitos avançados

Mudanças na expressão enzimática em resposta a ingestão de alimento regula o armazenamento de substratos energéticos

O **estado alimentado** está associado à **indução de enzimas que aumentam a síntese de ácidos graxos** no fígado. Um grande grupo de enzimas é induzido, incluindo aquelas envolvidas na glicólise, como, por exemplo, glicocinase (forma hepática da

hexocinase) e piruvato cinase, assim como enzimas ligadas à produção aumentada de NADPH (glicose-6-P desidrogenase, 6-P-gluconato desidrogenase, e enzima málica). Além disso, existe expressão aumentada de citrato liase, acetil-CoA carboxilase, ácido graxo sintase, e Δ^9 dessaturase.

Além disso, no estado alimentado, existe **uma repressão concomitante de enzimas-chave envolvidas na gliconeogênese.** Fosfoenolpiruvato carboxicinase, glicose-6-P fosfatase, e algumas aminotransferases encontram-se reduzidas em quantidade, ou por redução na síntese ou por aumento na degradação (Cap. 21).

Alongamento do ácido graxo

O alongamento da cadeia de ácido graxo além de 16 carbonos requer um outro conjunto de enzimas

O palmitato liberado da ácido graxo sintase se torna um substrato para a síntese de cadeias de ácidos graxos mais longas, com exceção de alguns ácidos graxos essenciais (ver adiante). O alongamento da cadeia ocorre através da adição de novos fragmentos de dois carbonos derivados do malonil-CoA (Fig. 16.5). Esse processo ocorre no retículo endoplasmático por ação de outro complexo multienzimático — a **ácido graxo alongase.** As reações que ocorrem durante o alongamento da cadeia são similares àquelas envolvidas na síntese de ácido graxo, com exceção do ácido graxo, que é acoplado à CoA, em vez da ACP. De fato, existem sete alongases de ácidos graxos diferentes com diversas expressões nos tecidos e especificidades para substratos (ELOVL9-7; ELOVL significa "alongamento de ácidos graxos de cadeia muito longa").

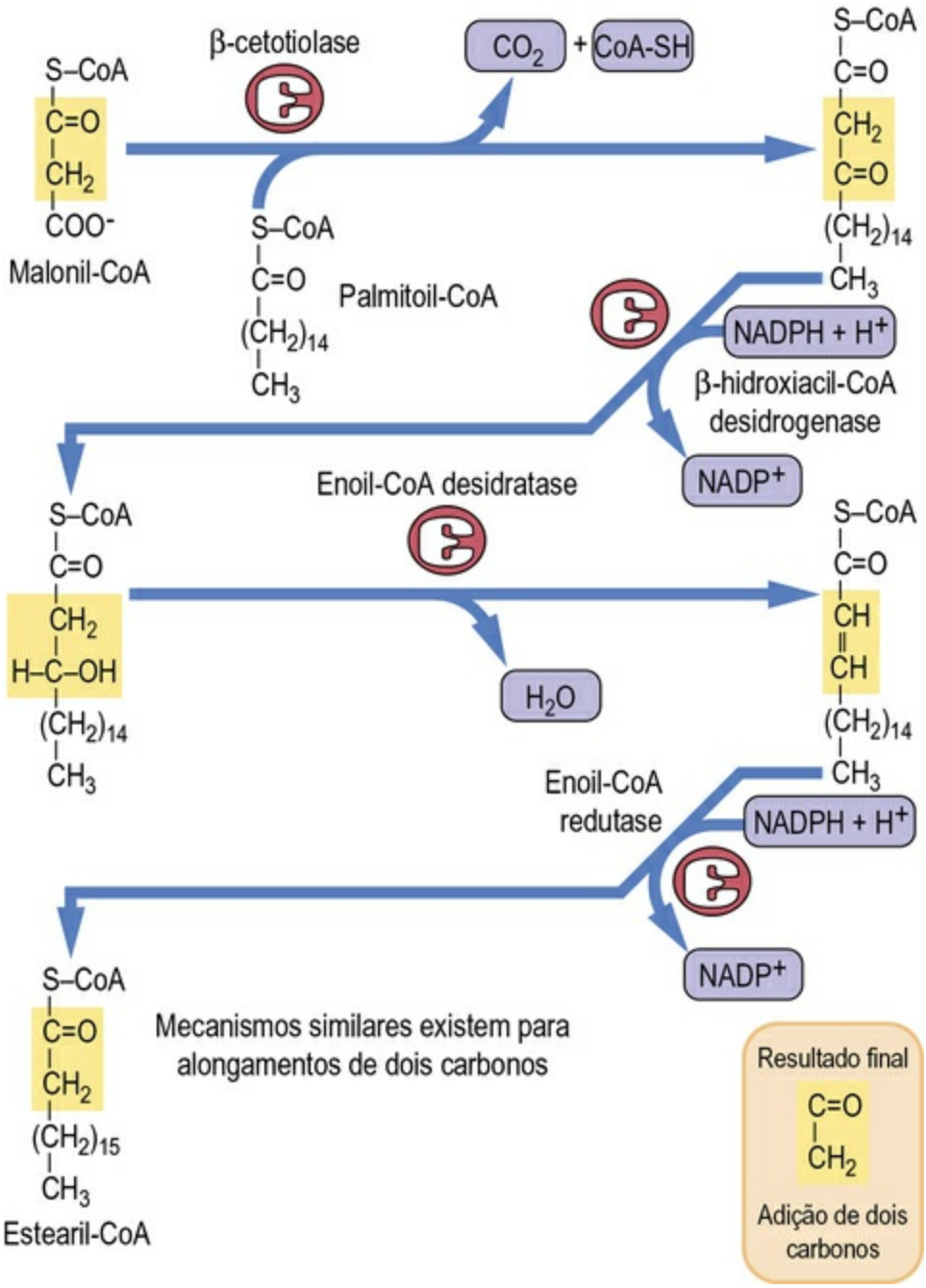


FIG. 16.5 Alongamento de ácidos graxos.
O alongamento de ácidos graxos ocorre no retículo endoplasmático e é efetuado por um complexo multienzimático, a ácido graxo alongase.

Os substratos para a ácido graxo alongase citosólica são ácidos graxos saturados com cadeia contendo de 10 carbonos para cima, e também ácidos graxos insaturados. Ácidos graxos de cadeia muito longa (22-24 carbonos) são produzidos no cérebro, e o alongamento do estearil-CoA (C_{18}) no cérebro aumenta rapidamente durante a mielinização, produzindo ácidos graxos requeridos para a síntese de esfingolipídios.

Os ácidos graxos também podem ser alongados na mitocôndria, onde outro sistema é utilizado: é NADH dependente e usa acetil-CoA como fonte de fragmentos de dois carbonos. É simplesmente o reverso da β-oxidação (Cap. 15) e os substratos para o alongamento de cadeia são ácidos graxos de cadeias média e curta contendo menos de 16 átomos de carbono. Durante o jejum e a inanição, o alongamento de ácidos graxos é intensamente reduzido.

Dessaturação de ácidos graxos

Reações de dessaturação requerem oxigênio molecular

O corpo tem necessidade de ácidos graxos mono e poli-insaturados, além dos ácidos graxos saturados. Alguns destes precisam ser fornecidos através da alimentação; esses dois ácidos graxos insaturados, linoleico e linolênico, são conhecidos como ácidos graxos essenciais (EFA). O sistema de dessaturação requer oxigênio molecular, NADH e citocromo b_5. O processo de dessaturação, assim como o de alongamento da cadeia, ocorre no retículo endoplasmático e resulta na oxidação de ambos, ácido graxo e NADH (Fig. 16.6).

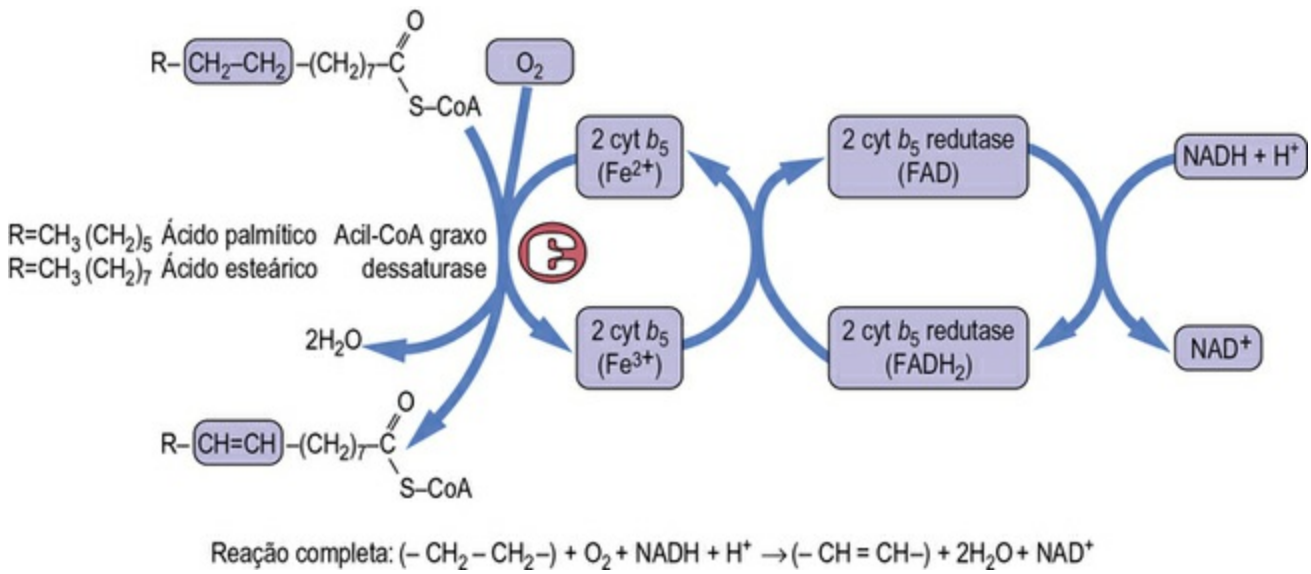


FIG. 16.6 Dessaturação de ácidos graxos.
A dessaturação de ácidos graxos ocorre no retículo endoplasmático. A reação requer oxigênio molecular, $NADH_2$, $FADH_2$ e citocromo b_5. cyt b_5, citocromo b_5; FAD, flavina adenina dinucleotídio; $FADH_2$, flavina adenina dinucleotídio reduzido.

No homem, o sistema da dessaturase é incapaz de introduzir duplas ligações entre átomos de carbono além do átomo de carbono-9 e carbono ω (metil terminal). A maioria das dessaturações ocorre entre os átomos de carbono 9 e 10 (chamados de dessaturações Δ^9), como, por exemplo, aquela com o ácido palmítico produzindo ácido palmitoleico (C-16:1, Δ^9) e aquela com o ácido esteárico produzindo ácido oleico (C-18:1, Δ^9). Esse passo é catalisado pela estearoil-CoA dessaturase (SCD).

Ácidos graxos essenciais

Os ácidos graxos ω-3 e ω-6 (ou seus precursores) devem ser fornecidos através da alimentação

Como discutido anteriormente, a dessaturase humana é incapaz de introduzir duplas ligações além de C-9. Por outro lado, dois tipos de ácidos graxos — aqueles contendo duplas ligações no terceiro carbono a partir do metil terminal **(ácidos graxos ω-3)** e no

sexto carbono a partir do metil terminal **(ácidos graxos ω-6)** — são necessários para a síntese de eicosanoides (ácidos graxos C-20), precursores de moléculas importantes como prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos. Portanto, os ácidos graxos ω-3 e ω-6 (ou seus precursores) devem ser fornecidos através da alimentação. De fato, eles são obtidos pelo consumo de óleos vegetais que contêm o ácido graxo ω-6, ácido linoleico (C-18:2, $\Delta^{9,12}$) e o ácido graxo ω-3, ácido linolênico (C-18:3, $\Delta^{9,12,15}$). O ácido linoleico é convertido por uma série de reações de alongamento e dessaturação em ácido araquidônico (C-20:4, $\Delta^{5,8,11,14}$), o precursor da síntese de outros eicosanoides no homem. O alongamento e a dessaturação do ácido linolênico produzem o ácido eicosapentaenoico (EPA; C-20:5, $\Delta^{5,8,11,14,17}$), que é um precursor de outra série de eicosanoides (Tabela 3.2). No entanto, a alongação/dessaturação do C-18:3, $\Delta^{9,12,15}$ a EPA ocorre a baixa velocidade; a maioria do EPA no corpo humano deriva do consumo de peixe.

Armazenamento e transporte de ácidos graxos: a síntese de triacilgliceróis

Ácidos graxos, derivados da síntese endógena ou da alimentação, são armazenados e transportados como triacilgliceróis

No fígado e no tecido adiposo, os triacilgliceróis (TAG) são produzidos por uma via envolvendo o ácido fosfatídico como intermediário (Fig. 16.7). A fonte de glicerol-fosfato é, no entanto, diferente nos dois tecidos. O **glicerol** é a fonte de ácido fosfatídico no fígado. Porém, no tecido adiposo, devido à falta de glicerol cinase, a **glicose** é a fonte indireta de glicerol, com o metabólito glicolítico di-hidroxiacetona fosfato sendo o seu precursor imediato.

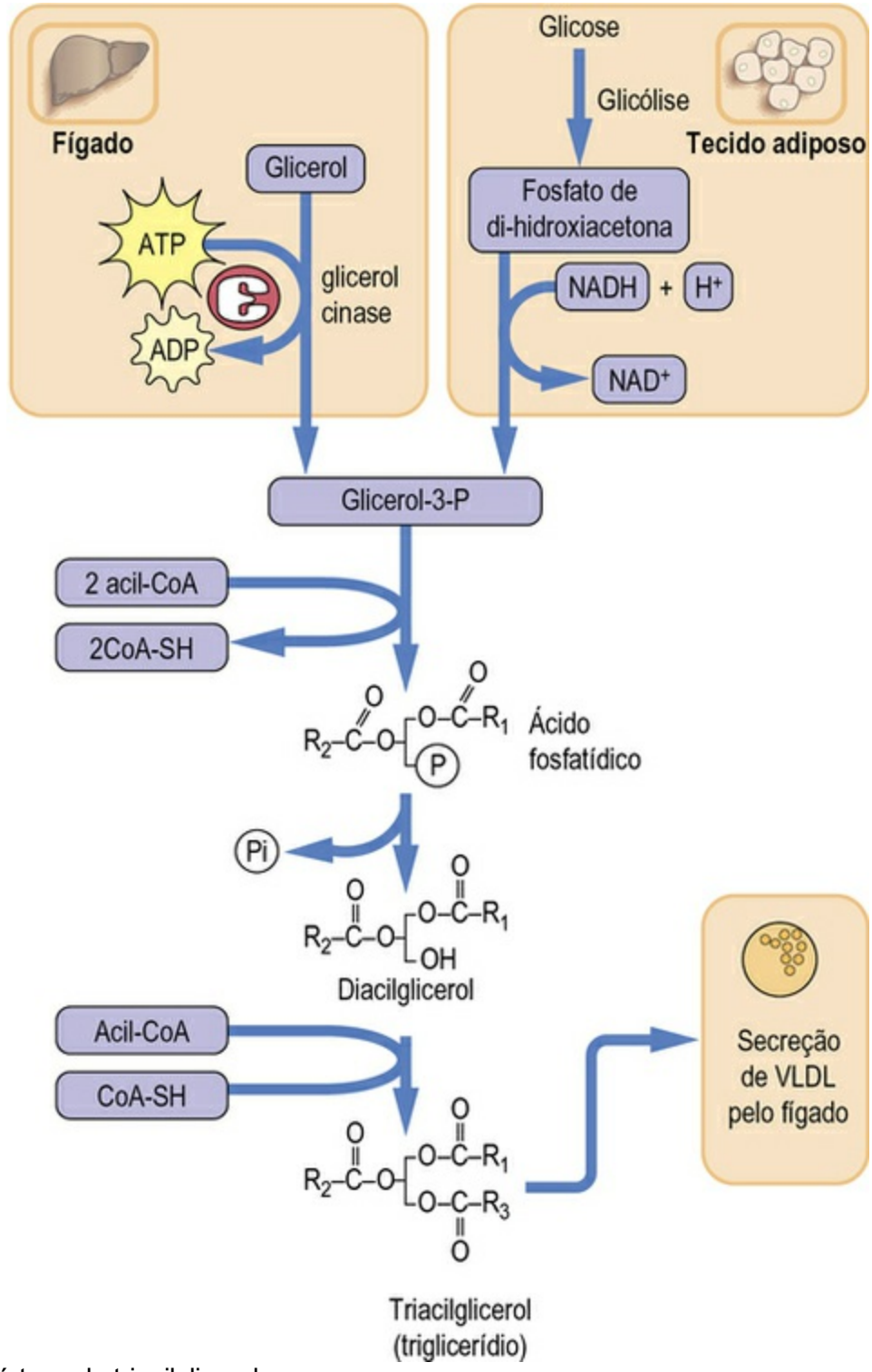


FIG. 16.7 Síntese do triacilglicerol.
Os triacilgliceróis (triglicerídios) são sintetizados no fígado e no tecido adiposo. A fonte de glicerol-3-P é diferente nos dois tecidos. No fígado é o glicerol, mas o tecido adiposo não possui atividade de glicerol cinase. Neste, o glicerol-3-P é formado a partir do intermediário da glicólise, di-hidroxiacetona fosfato. O "esqueleto" central das moléculas de ácido fosfatídico, diacilglicerol e triacilglicerol, apresentadas na figura, consiste em três átomos de carbono saturados com hidrogênios (compare com a Fig. 10.8).

Os triacilgliceróis produzidos no fígado, no retículo endoplasmático liso, podem ser armazenados apenas provisoriamente

O fígado tem a capacidade única de escoar os TAG armazenados produzindo complexos de lipoproteínas com colesterol, fosfolipídios e apolipoproteínas (estas últimas também

sintetizadas no retículo endoplasmático) para exportação sob a forma de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL). As VLDL são então processadas no complexo de Golgi e liberadas na corrente sanguínea para captação por outros tecidos. De forma a mobilizar os TAG armazenados transientemente, ocorre uma reação lipolítica. (Resulta na formação de diacilgliceróis (DAG), que podem entrar novamente na via sintética dos TAG de constituição de VLDL). A natureza dessa lipase ainda não é conhecida, mas tem significativo interesse médico devido às complicações da esteatose hepática.

Uma vez liberadas no sangue, as VLDL sofrem ação da lipoproteína lipase (LPL). Essa enzima é encontrada acoplada a glicoproteínas da membrana basal do endotélio capilar e é ativa tanto sobre VLDL quanto quilomícrons (Cap. 18).



Quadro clínico

Anormalidades lipídicas no alcoolismo

Uma mulher de 36 anos de idade atendida em um centro de saúde da mulher, apresentou concentrações séricas de triglicerídio de 73,0 mmol/L (6.388 mg/dL) e de colesterol de 13 mmol/L (503 mg/dL). Após uma evasiva inicial, ela admitiu beber três garrafas de vodca e seis garrafas de vinho por semana. Quando ela se absteve do álcool, a concentração de triglicerídio foi reduzida a 2 mmol/L (175 mg/dL) e a concentração de colesterol a 5 mmol/L (193 mg/dL). Três anos depois, a mulher se apresentou novamente com fígado dilatado e o retorno das anormalidades lipídicas. Uma biopsia do fígado indicou doença hepática alcoólica com esteatose, ou seja, células hepáticas infiltradas com gordura.

Comentário

Em indivíduos alcoólatras, o metabolismo do álcool produz quantidades aumentadas de nicotinamida adenina dinucleotídio reduzida (NADH) no fígado. Um aumento na razão $NADH+H^+/NAD^+$ inibe a oxidação de ácidos graxos. Ácidos graxos que chegam ao fígado, sejam de fontes alimentares ou mobilizados do tecido adiposo, são reesterificados com glicerol para formar triglicerídios. Nos estágios iniciais de alcoolismo, estes são reunidos com apolipoproteínas e secretados como lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL). **Concentrações crescentes de VLDL** e, portanto, de triglicerídios séricos, estão frequentemente presentes em estágios iniciais de doença hepática alcoólica. Com o progresso da doença hepática, surge uma falha na produção de apolipoproteínas e na secreção de gordura na forma de VLDL, resultando em um **acúmulo de triglicerídios nas células hepáticas.**

No estado alimentado, quando o tecido adiposo está captando ativamente ácidos graxos a partir de lipoproteínas e os armazenando sob a forma de TAG, os adipócitos sintetizam LPL e a secretam nos capilares do tecido adiposo. Esse aumento na síntese e secreção de LPL é estimulado pela insulina. Os níveis aumentados de insulina também estimulam a captação de glicose pelo tecido adiposo e promovem a glicólise. Isso tem

como efeito líquido a produção de quantidades crescentes de α-glicerofosfato, e este facilita a síntese de TAG nos adipócitos. O leito capilar do músculo esquelético também possui LPL, mas esta é inibida pela insulina. Em vez disso, a LPL é ativada no músculo esquelético por suas contrações.

A insulina é um hormônio importante para a síntese e armazenamento de ácido graxo. Ela promove a captação de glicose tanto no fígado quanto no tecido adiposo. No fígado, por aumentar os níveis de frutose-2,6-bifosfato, ela estimula a glicólise, aumentando assim a produção de piruvato. Ao estimular a desfosforilação do complexo piruvato desidrogenase e ativar assim essa enzima, a insulina promove a produção de acetil-CoA, estimulando o ciclo da TCA e aumentando os níveis de citrato que, por sua vez, através da estimulação da acetil-CoA carboxilase, aumentam a taxa de síntese de ácido graxo (Cap. 21).

Regulação dos estoques de gordura corporal total

O tecido adiposo é um órgão endócrino ativo

É sabido desde há muito que um aumento no consumo de energia sem um aumento adequado do gasto energético está associado à obesidade, a qual é caracterizada por adiposidade aumentada, tanto em termos de número de adipócitos quanto de seu conteúdo em gordura. Neste sentido, a quantidade armazenada de triacilglicerol é meramente uma consequência do balanço energético. No entanto, é agora claro que o tecido adiposo, longe de ser um reservatório de armazenamento inerte, é hormonalmente ativo. Os adipócitos produzem hormônios, como a leptina, adiponectina e resistina (coletivamente conhecidos como adipocinas); fatores de crescimento, como o fator de crescimento do endotélio vascular; e citocinas pró--inflamatórias, como o fator de necrose tumoral α (TNF-α) e a interleucina 6 (IL-6). Estes sinais hormonais, em particular a leptina, podem alterar o balanço energético. Este assunto é discutido em mais detalhe no Capítulo 22.



Quadro clínico

Estilo de vida e obesidade

Um ex-soldado de infantaria do exército, de 48 anos de idade (altura 1,91 m), apresentou problemas de ganho de peso nos últimos oito anos após sair do exército. No momento do seu afastamento da ativa, ele pesava 95 kg, mas no momento da consulta pesava 193 kg. Sua ocupação atual era motorista de caminhão. Ele negou qualquer mudança na dieta desde que saiu do exército, mas admitiu que pratica pouco ou nenhum exercício. Um questionamento detalhado indicou que sua dieta diária fornecia de 12.600 a 16.800 kJ (3.000 e 4.000 kcal), com ingesta de gordura próxima dos 40%. O paciente foi inicialmente colocado em uma dieta saudável, com ingesta de gordura reduzida para 35% do total de calorias. Aconselharam-no a se exercitar e ele

passou a nadar de três a quatro vezes por semana. Seu peso começou imediatamente a cair, rapidamente no início e depois de 3-4 kg por mês, até se estabilizar em 145-150 kg. Ele foi colocado, então, em uma dieta rica em proteína, e pobre em carboidrato e gordura, levando ao retorno da perda de peso que durou por mais um ano, resultando em um peso final de 93 kg.

Comentário

A obesidade vem crescendo em prevalência em muitas partes do mundo. **A obesidade clínica está claramente definida em termos de altura e peso através do índice de massa corporal (IMC),** que é calculado dividindo-se o peso em quilogramas pelo quadrado da altura em metros (ver detalhes no Capítulo 22).

Um IMC de 25-30 kg/m^2 é classificado como sobrepeso ou obesidade grau I, IMC >30 kg/m^2 é dito obesidade clínica ou de grau II, e IMC >40 kg/m^2 é classificado como obesidade mórbida ou de grau III. Nosso paciente tinha um IMC de 53 no momento da consulta caindo para 26 após dieta prolongada. Se o consumo de energia exceder o gasto de energia por tempo prolongado então haverá ganho de peso. **A obesidade predispõe a várias doenças.** A mais importante é o diabetes melito tipo 2: 80% dos casos desse tipo de diabetes estão associados à obesidade. Entre outras doenças associadas estão doença cardíaca coronariana, hipertensão, acidente vascular encefálico, artrite e doença de cálculos vesiculares.

Resumo

- A síntese e o armazenamento de ácidos graxos são componentes essenciais da homeostase da energia do corpo.
- A síntese dos ácidos graxos ocorre no citosol. Sua etapa-chave é a reação catalisada pela acetil-CoA carboxilase.
- O alongamento da cadeia de ácido graxo (até um comprimento de 16 átomos de carbono) é realizado pela ácido graxo sintase dimérica, que possui várias atividades enzimáticas. Tanto a acetil-CoA carboxilase como a síntese dos ácidos graxos estão sujeitas a uma regulação complexa.
- A lançadeira de malato facilita a transferência de unidades de dois carbonos da mitocôndria para o citoplasma para serem usadas na síntese dos ácidos graxos.
- O poder redutor para a síntese dos ácidos graxos na forma de NADPH é suprido pela via da pentose fosfato e também pela lançadeira de malato.
- Os ácidos graxos insaturados essenciais são o ácido linoleico e linolênico. O ácido linoleico é convertido em ácido araquidônico, que por sua vez serve como precursor de prostaglandinas.
- Sinais de adiposidade são fornecidos pelas adipocinas, particularmente a leptina. A insulina também é importante para a regulação da alimentação.

Questões para aprendizagem

1. Descreva como uma cadeia crescente de ácidos graxos é transferida entre as

subunidades da ácido graxo sintase.

2. Como os eicosanoides são sintetizados?
3. Explique por que a taxa de lipólise no estado de satisfação é baixa.
4. Descreva a etapa limitante da síntese de ácidos graxos e sua regulação.
5. Quais são as fontes de acetil-CoA para a síntese de ácido graxo?
6. Compare e contraste a síntese de ácidos graxos e sua oxidação.

Leituras sugeridas

Brown, M. S., Ye, J., Rawson, R. B., Goldstein, J. L. Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell*. 2000; 100:391–398.

Guillou, H., Zadravec, D., Martin, P. G., Jacobsson, A. The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Prog Lipid Res*. 2010; 49:186–199.

Gurr M.I., Harwood J.L.K., Frayn K.N., eds. Lipid biochemistry: an introduction. Oxford: Blackwell Science, 2008.

CAPÍTULO 17

Biossíntese de Colesterol e Esteroides

Marek H. Dominiczak, Graham Beastall† and A. Michael Wallace

Objetivos

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Listar os principais passos envolvidos na síntese da molécula de colesterol.
- Discutir a regulação da concentração intracelular de colesterol.
- Explicar os mecanismos que governam o metabolismo e a excreção de colesterol.
- Descrever os ácidos biliares e a sua circulação êntero-hepática.
- Resumir as principais vias de síntese dos hormônios esteroides.

Introdução

O colesterol é essencial à estrutura e função celular

O colesterol é um componente essencial das **membranas celulares** dos mamíferos. É também o precursor de importantes compostos, tais como **hormônios esteroides, vitamina D** e **ácidos biliares.** Os seres humanos sintetizam aproximadamente 1 g de colesterol todos os dias. A taxa de síntese de colesterol endógeno e sua ingestão pela dieta determinam sua concentração no plasma. Excesso de colesterol proveniente da dieta reduz sua síntese endógena.

Uma dieta ocidental típica contém aproximadamente 500 mg (1,2 mmol) de colesterol por dia, principalmente na carne, ovos e laticínios (Cap. 22). Em circunstâncias normais, 30-60% desse colesterol são absorvidos durante a passagem através dos intestinos. Após a absorção intestinal, o colesterol é transportado para o fígado e para os tecidos periféricos como um componente das lipoproteínas, os quilomícrons.

Na célula, todo o colesterol está presente nas membranas. Os eventos regulatórios ocorrem ou nas membranas ou em suas imediações

A síntese de colesterol celular e sua captação do fluido extracelular (principalmente como um componente das lipoproteínas de baixa densidade [LDL]) são rigorosamente regulados quer no nível da tradução quer no nível pós-traducional — e a concentração membranar de colesterol livre é o principal regulador da síntese de colesterol. Nos passos iniciais da via de síntese de colesterol são produzidos substratos utilizados para a síntese de compostos importantes para a proliferação celular, o transporte de elétrons e o combate do estresse oxidativo. Os principais intermediários na síntese de colesterol são o mevalonato, farnesil pirofosfato, esqualeno e lanosterol (Fig. 17.1). Os oxiesteróis formados nos passos mais tardios desta via também contribuem para a regulação da homeostasia do colesterol. Finalmente, um conjunto de transportadores geneticamente controlados regula a absorção de colesterol e seu transporte intestinal e biliar.

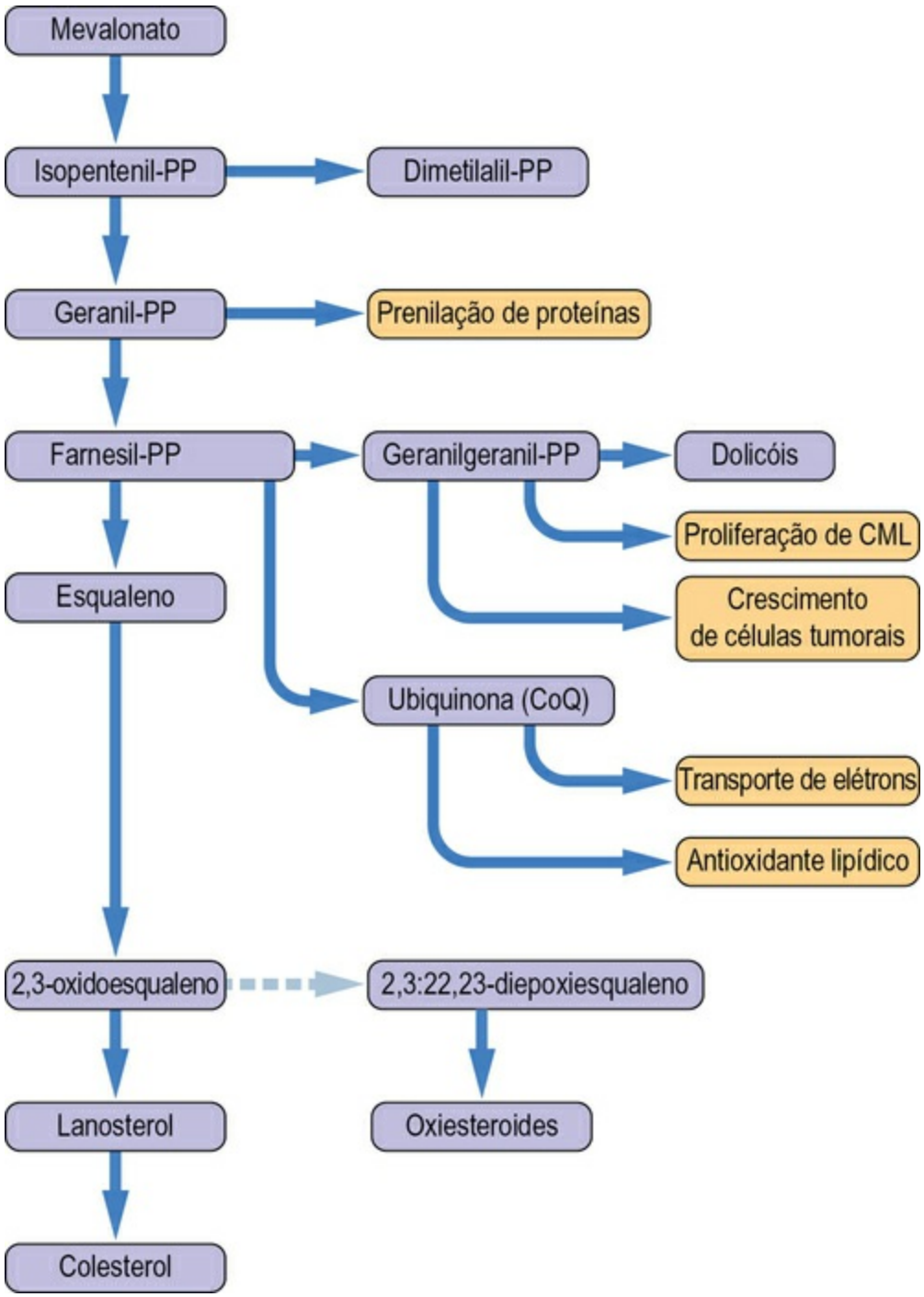


FIG. 17.1 Síntese de colesterol e vias relacionadas. A via de síntese de colesterol é também fonte de origem de compostos que participam de variadas funções celulares. Estas estão evidenciadas nas caixas laranja. (Modificado de Charlton-Menys V, Durrington PN. Exp Physiol 2007; 93:27–42, com permissão). CML, célula muscular lisa; CoQ, coenzima Q; PP, pirofosfato.

O fígado empacota novamente o colesterol e os triglicerídios em lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL). Após hidrólise periférica das VLDL pela lipoproteína lipase, as VLDL remanescentes e as LDL transportam o colesterol de volta para o fígado. O Capítulo 18 descreve o metabolismo das lipoproteínas em detalhe.

Os seres humanos não conseguem metabolizar o anel esteroide do colesterol

O colesterol é excretado pelo fígado na bílis, tanto na forma de ácidos biliares como de colesterol livre. Os ácidos biliares primários são aqueles produzidos no fígado, e outro "conjunto" denominado ácidos biliares secundários é produzido a partir dos primários pelas bactérias intestinais. A maior parte dos ácidos biliares é reabsorvida no íleo

terminal e reciclada de volta ao fígado.

Importância clínica

Um fornecimento excessivo de colesterol é importante na etiologia da aterosclerose (Cap. 18). O colesterol é também um componente principal dos cálculos biliares. Deficiências hereditárias de enzimas que participam na síntese de hormônios esteroides a partir do colesterol são outra causa de patologia clínica. Estas são particularmente importantes na medicina neonatal.

A Molécula de colesterol

A estrutura do colesterol está representada na Figura 17.2. Tem um peso molecular de 386 Da e contém 27 átomos de carbono, dos quais 17 estão incorporados em quatro anéis unidos (núcleo ciclopentanoperidrofenantreno). Outros dois carbonos adicionais estão em grupos metila, ligados nas junções dos anéis AB e CD, e os oito carbonos restantes estão na cadeia lateral. O colesterol é quase inteiramente composto por átomos de carbono e hidrogênio; existe um grupo hidroxila solitário ligado ao carbono 3. O colesterol também tem uma estrutura quase completamente saturada, tendo somente uma ligação dupla entre os átomos de carbono 5 e 6.

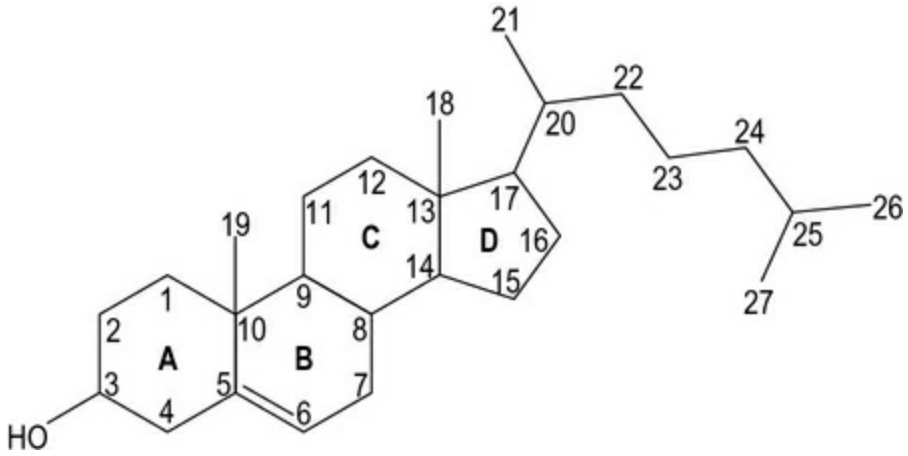


FIG. 17.2 Estrutura do colesterol. A–D é a notação convencional usada para descrever os quatro anéis. Os números 1–27 descrevem os átomos de carbono.

O colesterol altera a fluidez da membrana

O colesterol é um componente essencial das membranas celulares. É mantido na bicamada lipídica por interações físicas entre o seu anel esteroide planar e cadeias de ácidos graxos. A ausência de ligações covalentes significa que o colesterol pode se deslocar facilmente para dentro ou para fora da membrana. As membranas são estruturas fluidas, nas quais ambas as moléculas de lipídios e proteínas se movem e sofrem mudanças conformacionais (Cap. 8). Quanto mais fluida for a bicamada fosfolipídica, mais permeável será a membrana. À temperatura corporal, as cadeias longas de hidrocarbonetos da bicamada lipídica são capazes de movimentos

consideráveis. O colesterol está localizado entre essas cadeias de hidrocarbonetos. **O colesterol aumenta a fluidez das membranas** ricas em fosfolipídios e esfingolipídios que contenham ácidos graxos saturados.

O colesterol forma regiões de agregação dentro da bicamada lipídica. Nesses agregados pode chegar a existir 1 mol de colesterol por 1 mol de fosfolipídio, enquanto em áreas adjacentes pode não existir colesterol. Assim, a membrana contém zonas impermeáveis ricas em colesterol e áreas sem colesterol mais permeáveis. As várias organelas celulares podem diferir no seu teor de colesterol por um fator de 10. Por exemplo, está virtualmente ausente na membrana mitocondrial interna.

Colesterol livre e esterificado

O colesterol é fracamente solúvel em água. Apenas cerca de 30% do colesterol circulante se encontram na forma livre, a maioria forma ésteres com ácidos graxos de cadeia longa, incluindo os ácidos oleico e linoleico. Os ésteres de colesterol são ainda menos solúveis em água do que o colesterol livre.

O colesterol é esterificado no plasma pela enzima **colesterol-lecitina aciltransferase** e nas células pela **acil-CoA:colesterol aciltransferase (ACAT).** No plasma, o colesterol está incorporado em várias lipoproteínas (Cap. 18), principalmente na forma de ésteres de colesterol. Os ésteres de colesterol são armazenados em vesículas lipídicas no retículo endoplasmático (RE).

Absorção intestinal de colesterol

O colesterol é absorvido (e secretado) no intestino por transportadores específicos

O colesterol da dieta é absorvido no intestino através de um transportador de membrana, a proteína *Niemann-Pick C1-like* (NPC1L1). Outro transportador presente no lado apical (luminal) dos enterócitos é o *ATP-binding cassette* (ABC) G5/G8, que inclui dois transportadores complementares — ABCG5 e ABCG8. Estes transportam o colesterol no sentido "oposto", de volta ao lúmen do intestino, e também estão envolvidos na secreção de outros esteróis na bílis. A expressão desses transportadores é regulada positivamente por um fator de transcrição nuclear, o receptor hepático X (ver adiante). Os genes que codificam esses transportadores têm um elemento de resposta esterol em suas regiões promotoras. Mutações nesses genes resultam em acumulação tecidual de esteróis vegetais **(sitosterolemia).** O fármaco **ezetimibe** inibe o transporte de colesterol mediado por NPC1L1 e tem sido usado no tratamento da hipercolesterolemia.

Biossíntese de colesterol

O colesterol é sintetizado a partir de acetil-coenzima A

Virtualmente, todas as células humanas têm a capacidade de sintetizar colesterol. O fígado é o principal local de biossíntese de colesterol, e pequenas quantidades são

também sintetizadas no intestino, córtex adrenal e gônadas. A síntese da molécula de colesterol requer uma fonte de átomos de carbono, uma fonte de poder redutor e quantidades significativas de energia. A acetil-coenzima A (acetil-CoA) fornece um ponto de partida de alta energia. A acetil-CoA pode ser proveniente da β-oxidação de ácidos graxos de cadeia longa, da desidrogenação de piruvato ou da oxidação de aminoácidos cetogênicos, tais como leucina e isoleucina. O poder redutor é fornecido pela forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato (NADPH), formada na via dos fosfatos de pentose (Cap. 12).

Energia adicional é fornecida pela quebra de adenosina trifosfato (ATP). No total, a produção de 1 mol de colesterol necessita de 18 moles de acetil-CoA, 36 moles de ATP e 16 moles de NADPH. Todas as reações biossintéticas ocorrem no citoplasma, embora algumas das enzimas necessárias estejam ligadas às membranas do RE.

O ácido mevalônico é o primeiro composto na via de síntese de colesterol

Três moléculas de acetil-CoA são convertidas no composto de 6 carbonos, ácido mevalônico (Fig. 17.3). Os primeiros dois passos ocorrem no citoplasma e são reações de condensação que levam à formação de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). Essas reações, catalisadas pela acetoacetil-CoA tiolase e HMG-CoA sintase, são comuns à formação dos corpos cetônicos, embora esse último processo ocorra dentro da mitocôndria.

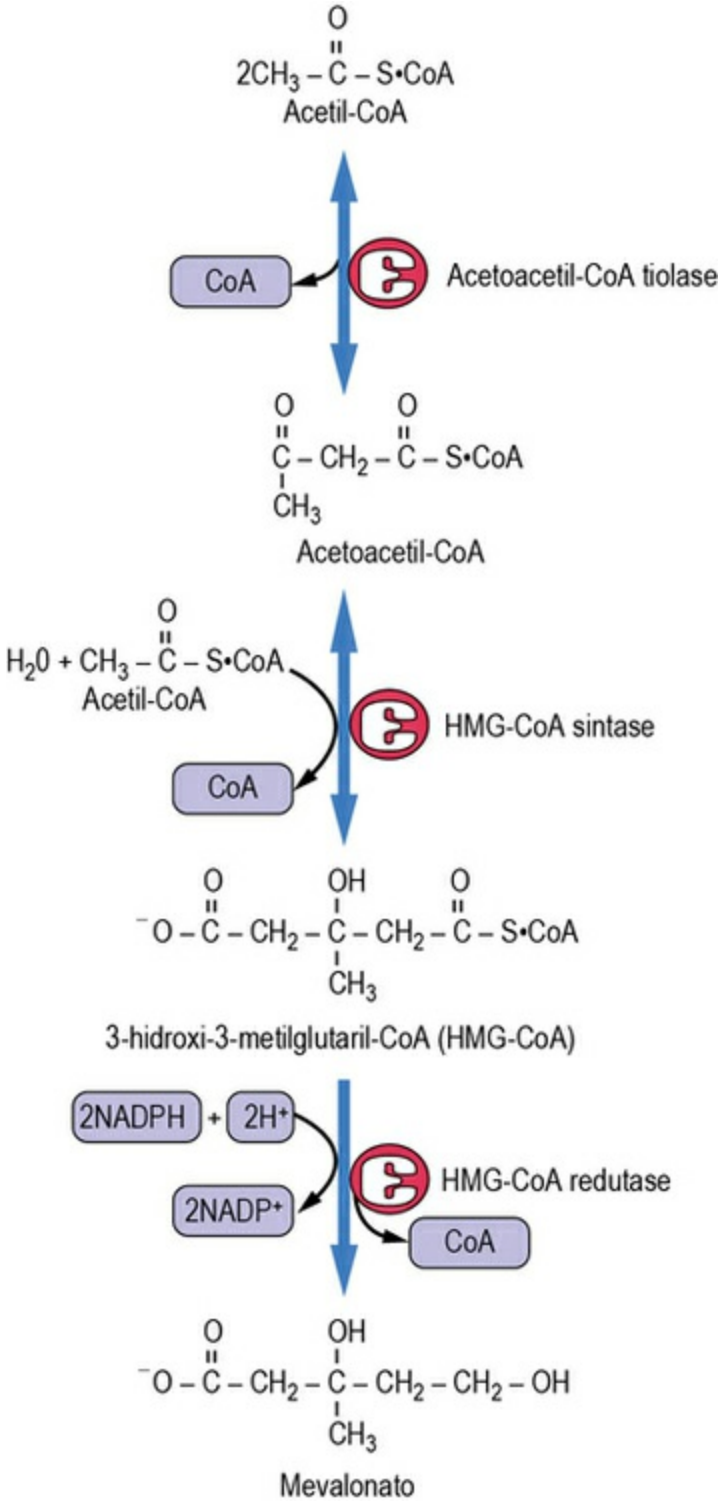


FIG. 17.3 Biossíntese do ácido mevalônico. O ácido mevalônico contém seis átomos de carbono, que são derivados de três moléculas de acetil-CoA.

A HMG-CoA redutase é a enzima velocidade limitante da via

A etapa limitante na biossíntese do colesterol é a reação catalisada pela enzima HMG-CoA redutase (HMGR), que leva à formação irreversível de ácido mevalônico. Essa reação necessita de duas moléculas de NADPH.

A HMGR é uma enzima do RE. Sua atividade é regulada em vários níveis: por retroalimentação negativa, pela taxa de degradação, por fosforilação (é ativa no seu estado não fosforilado) e por alteração da expressão gênica. É regulada também por vários hormônios: a insulina e a tri-iodotironina aumentam a atividade da enzima,

enquanto o glucagon e o cortisol inibem. A HMGR pode ainda ser fosforilada (e consequentemente inibida) pelo "sensor energético" da célula, a enzima cinase dependente de AMP (AMPK, Cap. 22). Os oxiesteróis também regulam a HMGR.

O farnesil pirofosfato é composto por três unidades isopreno

Três moléculas de ácido mevalônico vão ser fosforiladas em duas reações que requerem cinases e ATP. A descarboxilação subsequente origina as **unidades de isopreno isoméricas de 5 carbonos,** isopentenil pirofosfato e dimetilalil pirofosfato, que são depois condensadas para formar geranil pirofosfato. O geranil pirofosfato é condensado formando geranilgeranil pirofosfato. Uma condensação adicional com o isopentenil pirofosfato produz o farnesil pirofosfato, uma molécula de 15 átomos de carbono (Fig. 17.4). Além de intermediário na biossíntese de colesterol, o farnesil pirofosfato é o ponto de bifurcação para as vias de síntese de dolicol (substrato na síntese de glicoproteínas) e ubiquinona (Fig. 17.1).

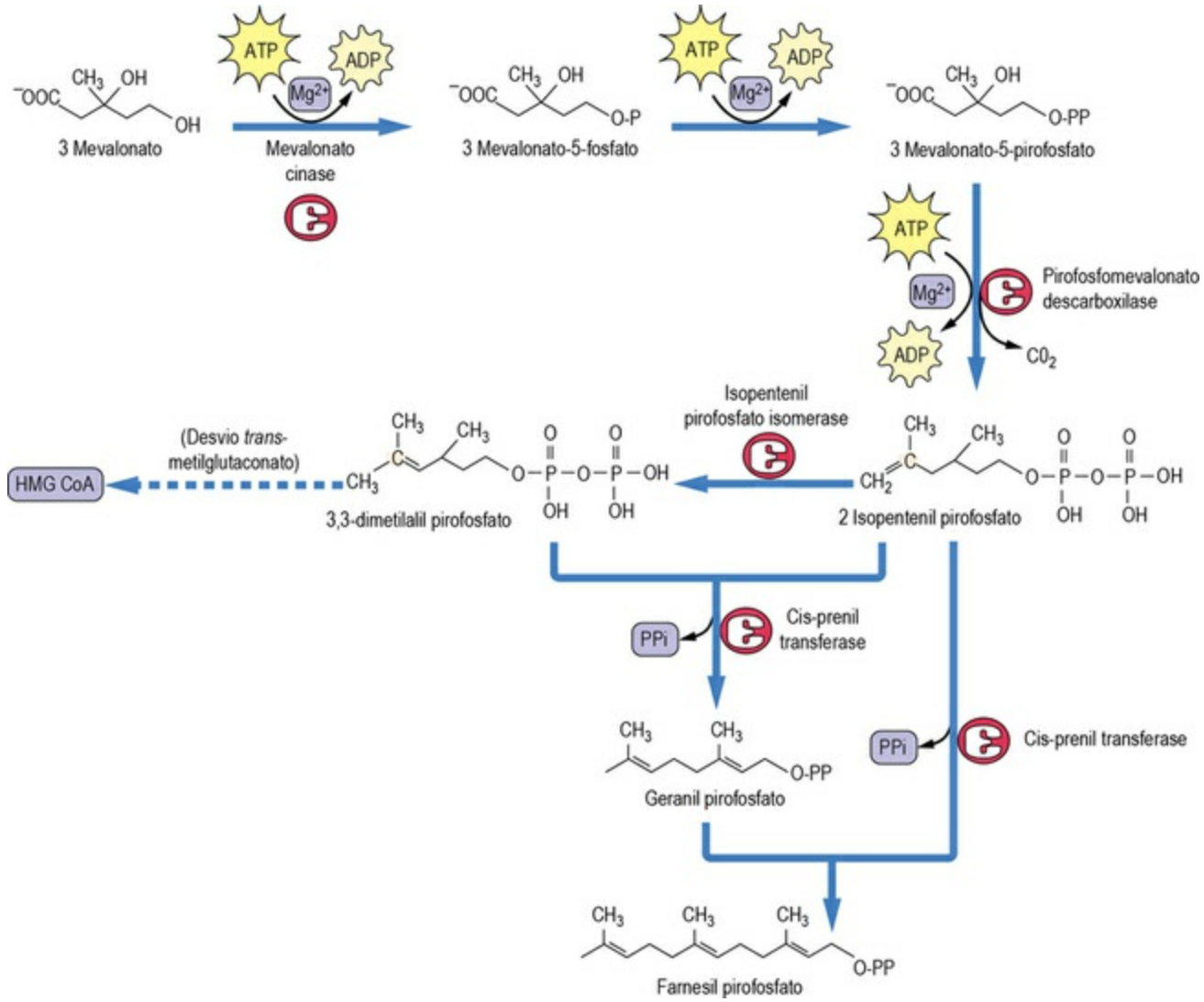


FIG. 17.4 Biossíntese do farnesil pirofosfato. O farnesil pirofosfato é composto por três unidades isopreno. Note que as unidades isopreno podem ser derivadas para o desvio *trans*-metilglutaconato, que "recupera" o HMG-CoA (ver texto para mais detalhes). ADP, adenosina difosfato.

O esqualeno é uma molécula linear capaz de formar um anel

A esqualeno sintase condensa duas moléculas de farnesil pirofosfato para formar **esqualeno,** um hidrocarboneto de 30 carbonos com seis ligações duplas (Fig. 17.5), o que lhe permite dobrar-se em um anel idêntico ao núcleo esteroide. Vários intermediários estão envolvidos nesta fase.

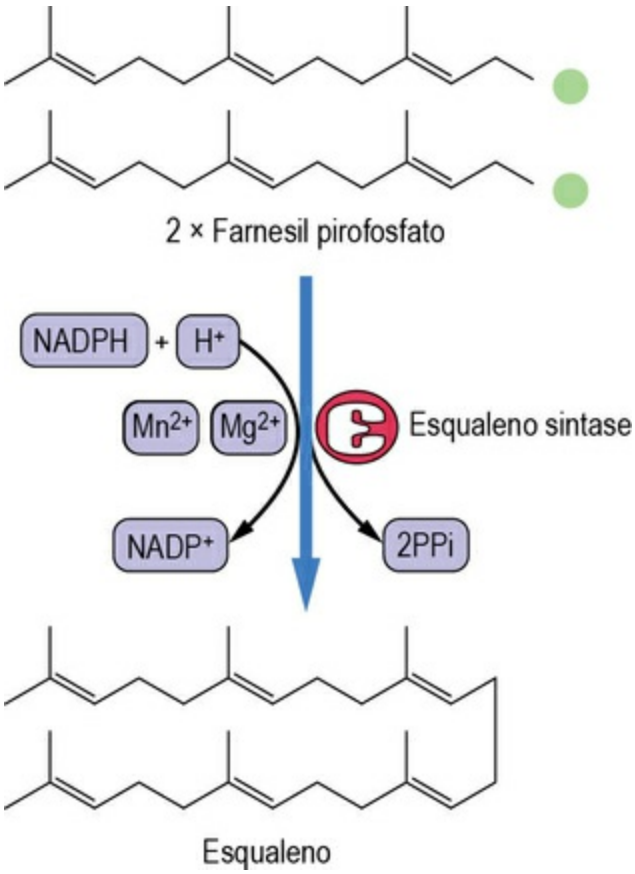


FIG. 17.5 Biossíntese de esqualeno. O esqualeno, uma molécula ainda linear, resulta da condensação de duas moléculas de farnesil pirofosfato. As seis ligações duplas permitem que a estrutura se dobre em um anel idêntico ao núcleo esteroide.

O esqualeno cicliza para formar lanosterol

Antes do encerramento do anel, o esqualeno é convertido a 2,3-oxidoesqualeno pela esqualeno monoxigenase. Essa monoxigenase dependente de NADPH adiciona uma molécula de oxigênio à estrutura. Daí em diante, a ciclização é catalisada pela oxidoesqualeno ciclase, originando o lanosterol (Fig. 17.6).

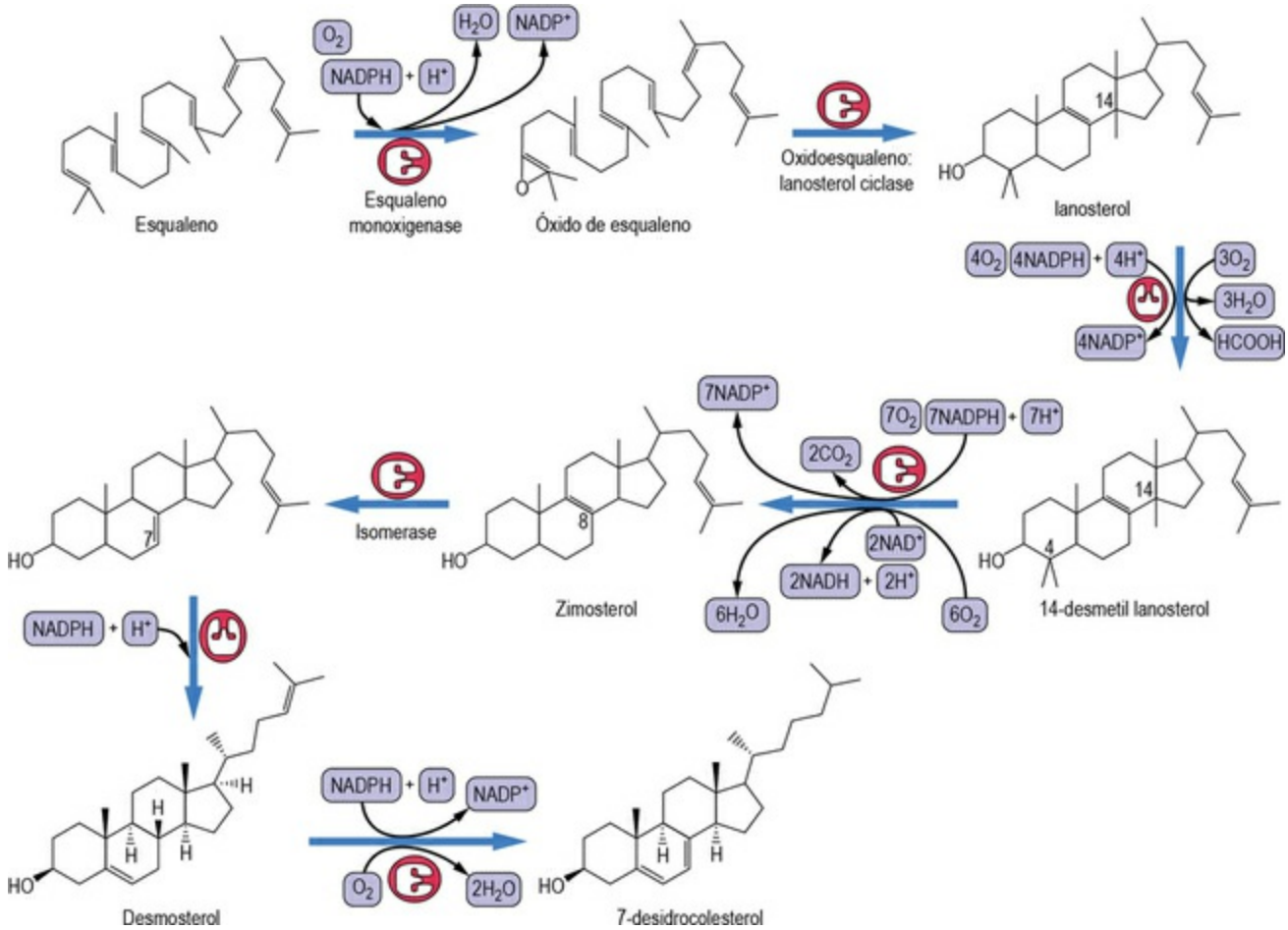


FIG. 17.6 Estágios finais da biossíntese do colesterol. Estas reações ocorrem enquanto ligadas às proteínas de ligação do esqualeno e esteróis. FAD, flavina adenina dinucleotídio; NADH, nicotinamida adenina dinucleotídio reduzida.

Nas plantas, existe um produto diferente da ciclização do esqualeno, o cicloartenol, que é metabolizado adicionalmente a uma variedade de fitoesteróis, incluindo o sitosterol, em vez de colesterol.

Os estágios finais da biossíntese de colesterol ocorrem em uma proteína transportadora

O esqualeno, o lanosterol e todos os intermediários subsequentes na biossíntese de colesterol são moléculas hidrofóbicas. De modo que as etapas finais da via possam ocorrer em meio aquoso, esses intermediários se ligam a proteínas de ligação do esqualeno e esteróis durante as reações. A conversão do lanosterol de 30 carbonos em colesterol de 27 carbonos envolve reações de descarboxilação, isomerização e uma redução (Fig. 17.6).

O colesterol pode ser convertido em oxiesteróis por oxidação de sua cadeia lateral. Os oxiesteróis são importantes para o metabolismo de colesterol no cérebro

Essa conversão é realizada por uma enzima do citocromo P450, colesterol 24-hidroxilase (CYP46A1, presente no cérebro) e 27-hidroxilase (CYP27A1, presente em outros tecidos). O 27-hidroxicolesterol pode atravessar a barreira hematoencefálica sem a necessidade de um transportador dependente de energia. O 25-hidroxicolesterol regula os receptores hepáticos X (LXRs). No cérebro, também através do LXR, regula a expressão da

apolipoproteína E (um importante transportador de colesterol no cérebro) e dos transportadores ABCA1, ABCG1 e ABCG4 presentes nas membranas dos astrócitos.



Quadro de conceitos avançados

A protease pcsk9 regula a degradação dos receptores de LDL

A **serina protease PCSK9** *(proproteina convertase subtilisin-like kexin type 9)* é um regulador dos receptores de LDL. A PCSK9 é secretada pelo fígado, está presente no plasma, e liga-se ao domínio extracelular do receptor de LDL. Após a internalização do complexo LDL- receptor, a PCSK9 vai impedir sua reciclagem de volta à membrana e promover sua degradação. A sobrexpressão de PCSK9 em ratos transgênicos reduz os níveis de receptores de LDL. Em **indivíduos hipercolesterolêmicos** com uma mutação de ganho de função, a PCSK9 tem uma afinidade aumentada para o receptor de LDL. Por outro lado, uma mutação de perda de função resulta em concentrações plasmáticas de colesterol mais reduzidas.

Medições de esteróis vegetais e precursores do colesterol são usadas como marcadores da absorção e metabolismo do colesterol

Nos estudos do metabolismo do colesterol, os esteróis vegetais campesterol, sitosterol e o esterol biliar 5α-colestanol têm sido usados como marcadores da absorção de colesterol. Por outro lado, as medições de precursores do colesterol, como o ácido mevalônico, esqualeno e lanosterol têm sido usados como marcadores da síntese de colesterol.

Regulação da síntese de colesterol

Ao nível do organismo, o colesterol provém da dieta ou da síntese *de novo*

Muitos fatores estão envolvidos na regulação da concentração intracelular de colesterol (Tabela 17.1). Em circunstâncias normais, existe uma relação inversa entre a ingestão de colesterol pela dieta e sua taxa de biossíntese. Isso garante uma provisão relativamente constante de colesterol; e também explica a razão pela qual uma restrição na dieta é apenas suscetível de alcançar uma redução moderada na concentração plasmática de colesterol.

Tabela 17.1

Regulação da concentração de colesterol intracelular

Fatores que aumentam a concentração de colesterol livre
Síntese *de novo*

Hidrólise dos ésteres de colesterol intracelulares pela enzima colesterol éster hidrolase
Ingestão de colesterol na dieta
Captação de LDL mediada por receptor: regulação positiva dos receptores de LDL
Fatores que reduzem a concentração intracelular de colesterol livre
Inibição da síntese *de novo*
Regulação negativa do receptor de LDL
Esterificação intracelular do colesterol pela acil-CoA:colesterol aciltransferase
Liberação de colesterol da célula para as lipoproteínas de alta densidade (HDL)
Conversão do colesterol a ácidos biliares ou hormônios esteroides
Fatores que influenciam a atividade da HMG-CoA redutase
Concentração intracelular de HMG-CoA
Concentração membranar de colesterol
Hormônios: insulina, tri-iodotironina, glucagon, cortisol

A célula obtém colesterol quer da síntese *de novo* quer do fornecimento externo

Note-se que o "fornecimento externo", no caso de uma célula, não equivale necessariamente a origem dietética. O colesterol exógeno alcança as células sendo transportado predominantemente nas lipoproteínas: como um componente dos quilomícrons remanescentes, das VLDL remanescentes ou das LDL. Estas lipoproteínas se ligam aos receptores apoB/E presentes nas membranas plasmáticas, e os complexos lipoproteína/receptor são internalizados (Cap. 18). No citoplasma, as vesículas que transportam os complexos internalizados sofrem a ação de enzimas lisossomais, as quais separam as LDL do receptor e hidrolisam os ésteres de colesterol. O colesterol livre é liberado para a membrana. A apoproteína B presente nas LDL é degradada.

A regulação da concentração intracelular de colesterol envolve a HMG-CoA redutase, o receptor de LDL, a 7α-hidroxilase e uma rede de receptores nucleares

As duas fontes de colesterol intracelular, a síntese *de novo* e o fornecimento externo pelas lipoproteínas, estão reciprocamente relacionadas. A concentração de colesterol intracelular (intramembranar) é um fator-chave, regulando tanto a síntese celular de colesterol quanto a expressão de receptores de LDL. Assim, um aumento da concentração intracelular de colesterol livre resulta no seguinte (Fig. 17.7):

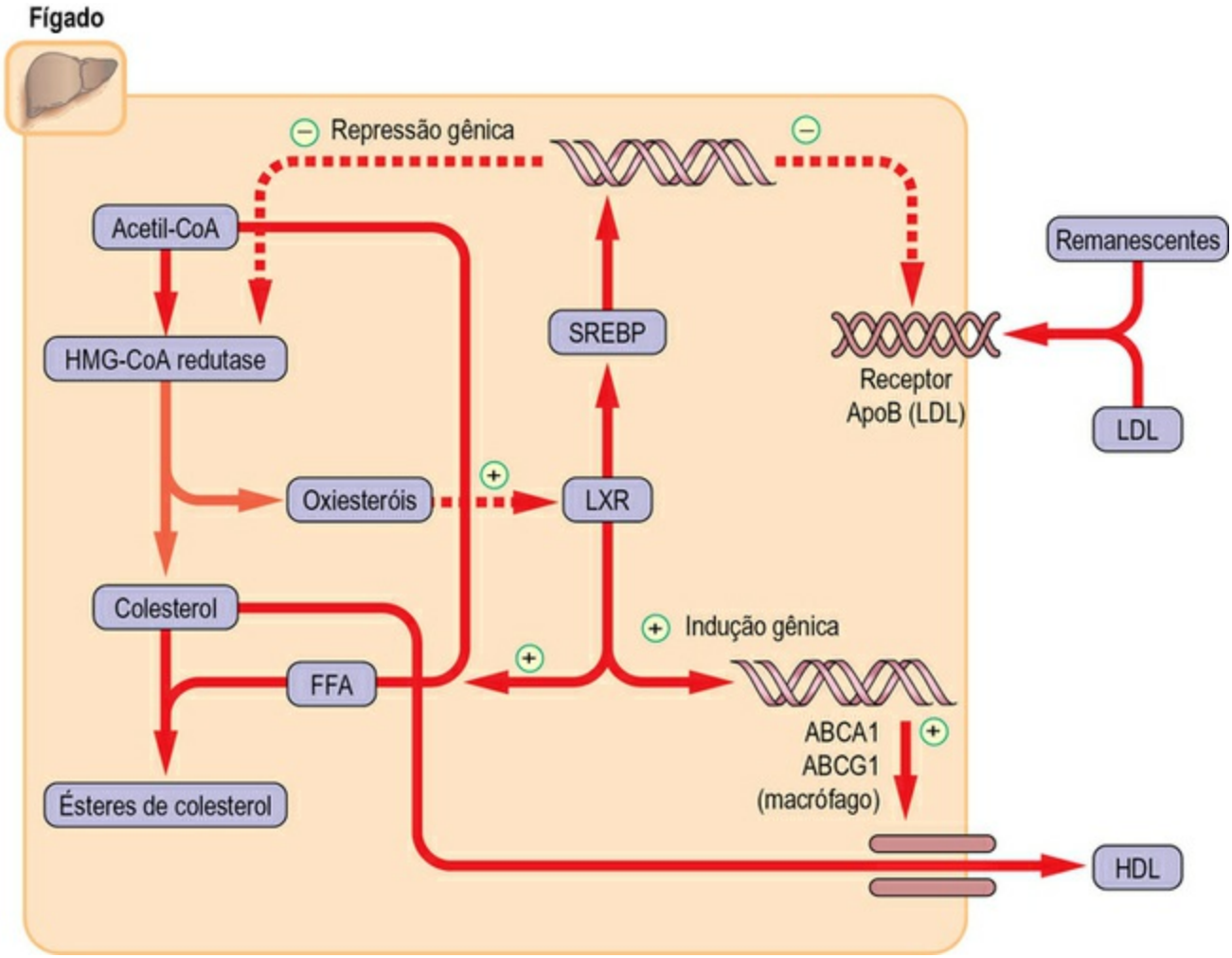


FIG. 17.7 Regulação da concentração intracelular de colesterol. O colesterol livre da membrana (e os oxisteróis) regula a concentração intracelular de colesterol pela indução ou supressão da expressão gênica. Observe que um aumento da concentração intracelular de colesterol irá inibir a síntese de HMG-CoA redutase e do receptor ApoB/E e, simultaneamente, aumentar a esterificação do colesterol e seu transporte das células. Ver o texto para mais detalhes. FFA: ácidos graxos livres; Acetil-CoA: acetil-coenzima A; LXR: receptor hepático X; SREBP: proteína de ligação a elemento regulador de esteróis.

- Redução tanto na atividade quanto na expressão da HMG-CoA redutase. Isso limita a síntese de colesterol.
- Regulação negativa dos receptores de LDL. Isso limita a captação celular de colesterol.
- Aumento do efluxo de colesterol e fosfolipídios da célula para as apoproteínas A (ou seja, as lipoproteínas de alta densidade [HDL]).
- Aumento da taxa de conversão de colesterol para ácidos biliares. Isso aumenta a excreção de colesterol.

As proteínas de ligação a um elemento regulador de esteróis (SREBPs) regulam os genes que codificam enzimas envolvidas na síntese de colesterol

As SREBPs são sintetizadas como precursores inativos de 120 kDa, sendo parte integral da membrana do RE. Ligam-se no RE à proteína ativadora da clivagem de SREBP (SCAP). O complexo SCAP/SREBP é transferido do RE para o aparelho de Golgi, onde as SREBPs são clivadas por uma protease para libertar os fatores de transcrição ativos, que se translocam para o núcleo e ativam todos os genes da via de síntese de colesterol (Fig. 17.7). Este processo está sujeito a engenhosos processos de regulação.

As moléculas de colesterol se ligam a domínios sensores de esteróis intermembranares ("receptores" de colesterol) presentes na proteína SCAP. Isso vai permitir a ligação do complexo SCAP/SREBP a outra proteína do RE, Insig-1 (Insig significa "gene induzido pela insulina"). A estabilidade do complexo SCAP/SREBP/Insig-1 é um evento de regulação-chave. O processo decorre da seguinte forma:

Quadro de conceitos avançados

Desvio transmetilglutaconato

O dimetilalil pirofosfato, uma das **unidades isopreno** formadas a partir do mevalonato (Fig. 17.4), pode ser desfosforilado e clivado em **acetoacetato** e **acetil-CoA,** que por sua vez podem ser desviados para outras vias, tais como a biossíntese de ácidos graxos. Este mecanismo é conhecido como desvio do transmetilglutaconato. Assim, compostos de alta energia, previamente destinados a serem convertidos em colesterol, podem ser redirecionados para satisfazer necessidades de maior prioridade. Note que um aumento na síntese de ácidos graxos vai aumentar a quantidade de substrato para a esterificação do colesterol.

Quando o colesterol está baixo, o complexo SCAP/SREBP se dissocia de Insig-1 e se desloca para o aparelho de Golgi. Contudo, **quando a concentração de colesterol na membrana é alta,** a ligação de colesterol à SCAP induz alterações conformacionais que estabilizam o complexo SCAP/SREBP/Insig-1, bloqueando sua deslocação para o Golgi. Consequentemente, vai existir uma diminuição na SREBP nuclear, e a transcrição de genes associados à síntese de colesterol permanece reprimida. A síntese de colesterol fica inibida. Excesso de colesterol também vai diminuir o nível de mRNA de Insig-1 (Fig. 17.8).

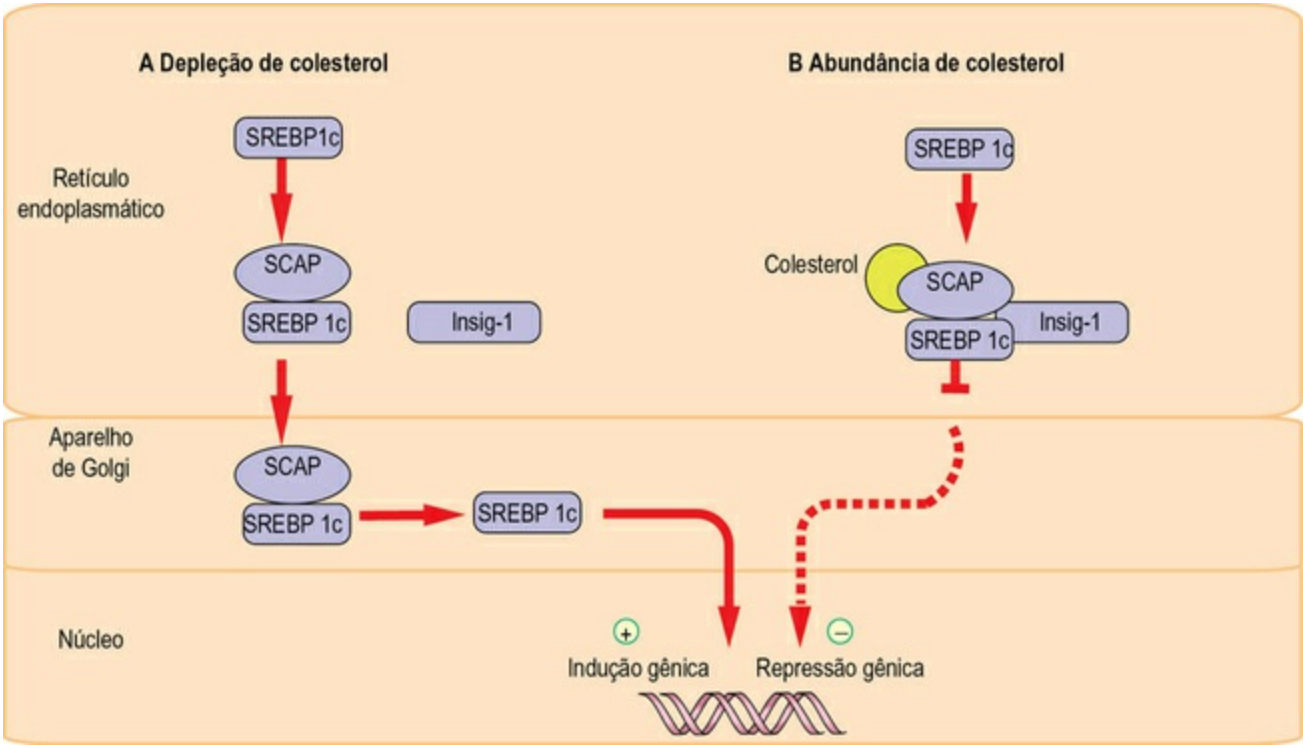


FIG. 17.8 Controle da transcrição gênica pelos fatores de transcrição regulados por esteróis (SREBPs). **(A)** Quando a concentração de colesterol livre na membrana é baixa, o complexo SCAP/SREBP é transferido do RE para o aparelho de Golgi. Ocorre, então, proteólise e o fator de transcrição ativo entra no núcleo e inicia a transcrição gênica. **(B)** Quando a concentração de colesterol livre na membrana é alta, a mudança conformacional induzida pela ligação do colesterol na proteína SCAP estabiliza sua ligação à Insig-1. O complexo permanece no RE com o SREBP em sua forma inativa, e a transcrição gênica é reprimida. Ver texto para mais detalhes. RE, retículo endoplasmático; SREBP, proteína de ligação ao elemento regulador de esteróis; SCAP, proteína ativadora da clivagem de SREBP.

Quando o nível de colesterol volta a ficar baixo, as proteínas SCAP/SREBP se dissociam de Insig-1 e o complexo fica novamente livre para se deslocar para o Golgi, restaurando os níveis nucleares de SREBP e reiniciando a síntese de colesterol. As SREBPs induzem também a síntese de Insig-1.

HMG-CoA redutase é regulada pelo colesterol por um mecanismo que envolve sua degradação

HMGR também possui um domínio sensor de esterol. Quando o nível de colesterol está elevado, HMGR, à semelhança do complexo SCAP/SREBP, liga-se à proteína Insig-1. No entanto, nesse caso o efeito da ligação é diferente: aumenta a ubiquitinação da enzima e impulsiona sua degradação. O efeito final é a inibição da síntese de colesterol.

SREBPs têm uma grande amplitude de efeitos na síntese de colesterol e ácidos graxos

Além do efeito na síntese do colesterol, as SREBPs **aumentam a expressão do gene do receptor de LDL** e modulam **a síntese de ácidos graxos.** Nos mamíferos, existem duas SREBPS estreitamente relacionadas: SREBP 1a e 1c. São produzidas pelo mesmo gene, através de *splicing* alternativo. A SREBP2 regula a síntese de colesterol e a expressão gênica do receptor de LDL, enquanto a SREBP1c controla a síntese de ácidos graxos. A SREBP1 induz todos os genes responsivos às SREBP.

SREBP1c pode ser ativada por receptores hepáticos X

SREBP1c é regulada positivamente pelos receptores hepáticos X (LXRs). LXRs são **fatores de transcrição ativados por ligandos,** membros da superfamília de receptores nucleares (Cap. 40). Formam **heterodímeros** com outras moléculas semelhantes, como os **receptores X de retinoides** (RXRs) e **receptores X de farnesil** (FXRs). Os complexos resultantes vão se ligar aos elementos de resposta LXR no DNA, regulando a expressão gênica. O LXR detecta a concentração intracelular de colesterol e contribui para a regulação quer da sua síntese, quer do seu efluxo das células. Contudo, não é o próprio colesterol que se liga ao LXR, mas antes oxiesteróis, tais como o 25-hidroxicolesterol ou o 27-hidroxicolesterol (Fig. 17.1).

A SREBP1c regula o efluxo de colesterol das células

Uma concentração elevada de colesterol no hepatócito induz, também através do mecanismo LXR-SREBP1c, a transcrição de genes que codificam transportadores de colesterol, responsáveis por controlar seu efluxo das células para partículas HDL: a expressão de ABCA1 (o transportador que controla o efluxo de colesterol das células para partículas HDL nascentes) e de ABCG1 (o transportador que estimula o efluxo de colesterol para partículas mais maduras, HDL2 e HDL3). Observe que outro fator de transcrição, o PPARα, também regula o efluxo de colesterol atuando através do LXR (Cap. 18). O PPARα é afetado por um grupo de fármacos hipolipemiantes conhecido como **fibratos** (**derivados do** ácido fíbrico).

A SREBP1c regula a síntese de ácidos graxos

Concentrações intracelulares de colesterol elevadas também induzem (através da SREBP1c) os genes que codificam todas as enzimas envolvidas na síntese de ácidos graxos. O aumento da disponibilidade de ácidos graxos fornece substratos para a esterificação do colesterol. Assim, um aumento da concentração de colesterol aumenta a concentração de oxiesteróis, o que por sua vez estimula a síntese de ácidos graxos, fornecendo o substrato para a esterificação de colesterol. A SREBP1c induz também os genes envolvidos na formação de NADPH e na síntese de triglicerídios e fosfolipídios.

Estatinas são fármacos que inibem a HMG-CoA redutase

Os inibidores da HMGR, também conhecidos como **estatinas**, reduzem os níveis de colesterol através de sua ligação à enzima, no sítio de ligação do HMG-CoA, inibindo competitivamente sua atividade. Isso resulta na diminuição da concentração intracelular de colesterol. A diminuição do colesterol livre estimula a expressão de receptores LDL. Aumenta, então, a captação de LDL e o colesterol LDL plasmático diminui. A HMGR hepática exibe um ritmo circadiano: sua atividade é máxima aproximadamente 6 horas após escurecer e mínima 6 horas após exposição à luz. Desse modo, as estatinas são habitualmente tomadas à noite para assegurar a máxima eficácia.

Ácidos biliares

O fígado elimina colesterol na sua forma livre ou como ácidos biliares

Os ácidos biliares são, quantitativamente, os produtos metabólicos do colesterol mais abundantes. No homem, existem quatro ácidos biliares principais (Fig. 17.9). Todos eles têm 24 átomos de carbono: os três átomos de carbono terminais da cadeia lateral do colesterol são removidos durante a síntese. Possuem também um núcleo esteroide saturado e se diferenciam apenas no número e posição dos grupos hidroxila adicionais. Todos esses grupos hidroxila têm a configuração α (ou seja, abaixo do plano do núcleo). Isso significa que tem de ocorrer a isomerização do grupo hidroxila 3β do colesterol.

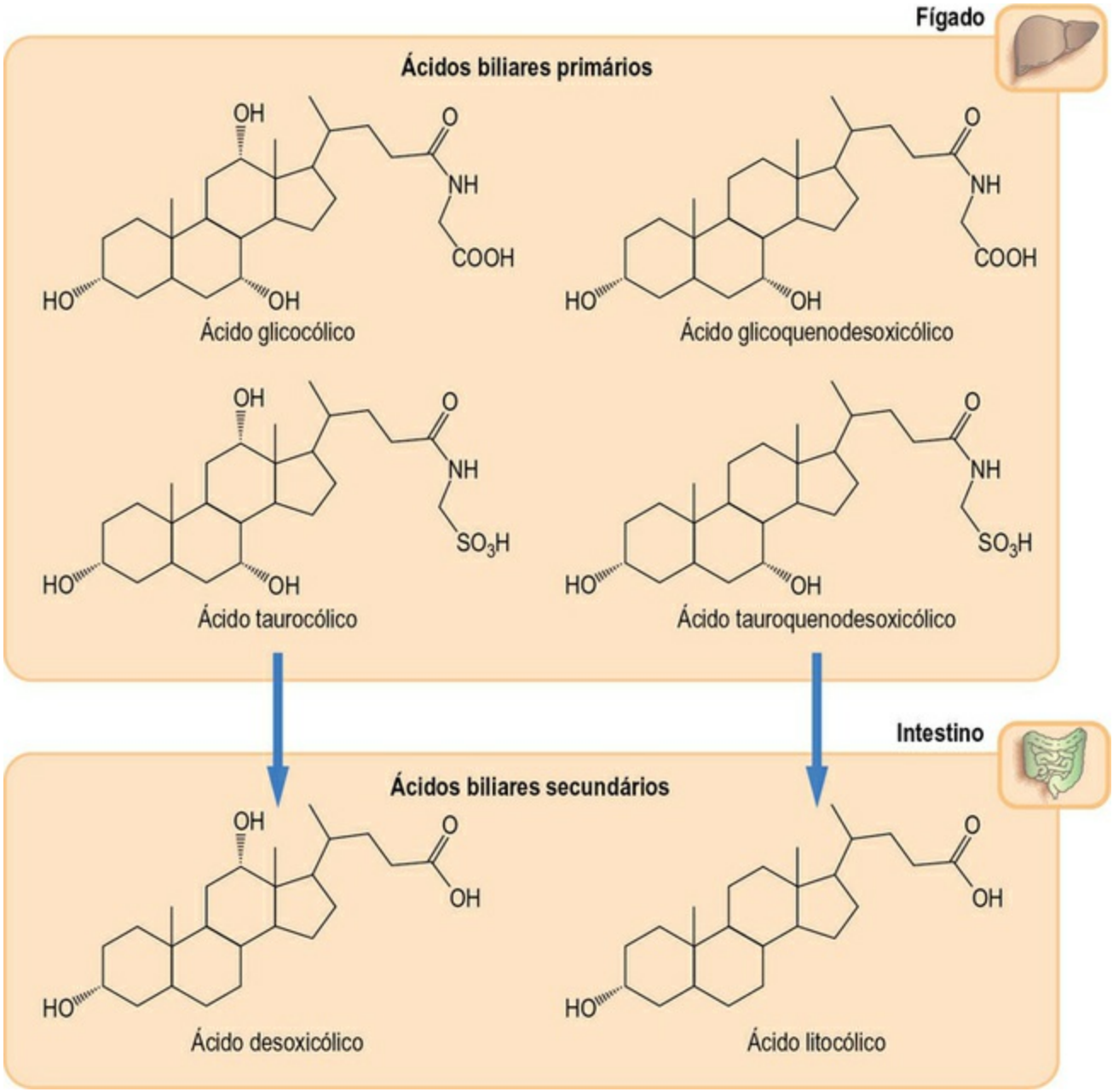


FIG. 17.9 Estrutura dos ácidos biliares. Os ácidos biliares primários são sintetizados no fígado. Estes são convertidos pelas bactérias intestinais em ácidos biliares secundários.

Os ácidos biliares primários são sintetizados no fígado

A biossíntese de ácidos biliares ocorre nas células parenquimatosas do fígado, onde os **ácidos cólico** e **quenodesoxicólico** são produzidos. Estes são conhecidos como os ácidos

biliares primários. A etapa limitante na biossíntese é a reação catalisada pela **7α-hidroxilase** microssomal (também designada por CYP7A1), que introduz um grupo hidroxila na posição 7α do anel de colesterol. Essa enzima é também uma monoxigenase microssomal (compare com as envolvidas na síntese do colesterol).



Quadro clínico

Homem de 50 anos com hipercolesterolemia tratada com estatina

Apesar de uma dieta restrita com baixo teor de colesterol, um homem de 50 anos, com história familiar de doença cardiovascular precoce, tinha uma concentração sanguínea de colesterol de 8,0 mmol/L (309 mg/dL); a concentração desejável é de 4,0 mmol/L (<155 mg/dL). Era ainda fumador, consumindo 15 cigarros por dia. Foi-lhe aconselhada a cessação tabágica e prescrita uma estatina. Tolerou bem a terapêutica e 3 meses depois seu colesterol era de 5,5 mmol/L (212 mg/dL). A dose de estatina foi aumentada e após mais 3 meses sua concentração plasmática de colesterol era de 4,1 mmol/L (158 mg/dL).

Comentário

A inibição parcial da HMGR resulta em uma diminuição de 30-50% do colesterol plasmático total e de 30-60% do colesterol LDL. Atualmente está disponível uma grande variedade de estatinas: tal se seguiu à descoberta de que a compactina (posteriormente renomeada de mevastatina), um metabólito fúngico isolado do *Penicillium citrinum*, tinha propriedades inibitórias da HMGR. A inibição da atividade da HMGR leva à diminuição da concentração intracelular de colesterol livre e ao aumento subsequente da expressão membranar do receptor de LDL (Cap. 18). O resultado final é a diminuição do colesterol plasmático total e do colesterol LDL.

Antes de sua secreção, os ácidos biliares primários são **conjugados** através de seu grupo carboxila, formando ligações amida com **glicina** ou **taurina.** No homem, existe uma razão 3:1 a favor dos conjugados de glicina. Por conseguinte, os principais produtos secretados são os ácidos glicocólico, glicoquenodesoxicólico, taurocólico e tauroquenodesoxicólico. A um pH fisiológico, os ácidos biliares estão maioritariamente ionizados, logo se apresentam como sais de sódio ou potássio. Os termos "ácidos biliares" e "sais biliares" são usados indiferentemente. Como seus nomes sugerem, esses compostos podem ser diretamente secretados no duodeno ou armazenados na vesícula biliar. Constituem um importante componente da bílis, em conjunto com a água, fosfolipídios, colesterol e produtos de excreção como a bilirrubina.

Os receptores hepáticos X participam na síntese e secreção da bílis

O colesterol é bombeado para a bílis pelas **proteínas transportadoras ABCG5 e ABCG8,** cuja expressão é regulada pelo LXR. Importantemente, a bílis supersaturada com colesterol facilita a formação de cálculos biliares de colesterol. O LXR coordena a

expressão de vários genes relevantes para a excreção de colesterol, incluindo a expressão da 7α-hidroxilase. A excreção de colesterol para a bílis é também regulada por outros receptores nucleares: o receptor X de farnesil (FXR) forma um heterodímero com o receptor X de retinoides que se liga aos elementos de resposta do ácido biliar no DNA. O FXR atua como sensor celular de ácidos biliares ligando-se a eles e inibindo sua síntese. O FXR também induz a bomba de exportação de ácidos biliares ABCB11, que remove os ácidos biliares do hepatócito para a bílis.

Os ácidos biliares secundários são sintetizados no intestino

Os ácidos biliares secundários se formam dentro do intestino pela ação de bactérias anaeróbicas (principalmente *Bacteroides*) nos ácidos biliares primários. Estes são os ácidos desoxicólico e litocólico (Fig. 17.9). Apenas uma parte dos ácidos biliares primários é convertida em ácidos biliares secundários. Essa conversão necessita da hidrólise da ligação amida, à glicina ou taurina, antes da remoção do grupo 7α-hidroxila.

Os ácidos biliares ajudam na digestão da gordura da dieta

A secreção de bílis a partir do fígado e o esvaziamento da vesícula biliar são controlados pelos hormônios gastrintestinais hepatocrinina e colecistocinina, respectivamente. São libertados quando os alimentos parcialmente digeridos passam do estômago para o duodeno. Uma vez secretados para o intestino, os ácidos biliares atuam como detergentes (possuem grupos polares carboxila e hidroxila), auxiliando na emulsificação dos lipídios ingeridos; isso ajuda a digestão enzimática e absorção da gordura da dieta (Cap. 10).

Os ácidos biliares entram na circulação êntero-hepática

Até 30 g de ácidos biliares passam do ducto biliar para dentro do intestino diariamente, mas somente 2% dessa quantidade (aproximadamente 0,5 g) é perdida pelas fezes. A maioria é desconjugada e reabsorvida. Sua reabsorção passiva ocorre no jejuno e cólon, mas a maioria é reabsorvida por transporte ativo no íleo. Os ácidos biliares reabsorvidos são transportados de volta ao fígado pela veia porta, ligados não covalentemente à albumina, e são novamente secretados na bílis. O processo é conhecido como circulação êntero-hepática. Esta recirculação explica por que a bílis contém ambos os ácidos biliares primários e secundários. O conteúdo total de ácidos biliares é de somente 3 g, portanto têm de recircular 5-10 vezes por dia.

O fluxo de ácidos biliares também contribui para o controle da síntese de ácidos biliares; a 7α-hidroxilase é alvo de retroalimentação negativa pelos ácidos biliares que regressam ao fígado pela veia porta. Os ácidos biliares da dieta também diminuem a expressão de 7α-hidroxilase. O metabolismo dos ácidos biliares está resumido na Figura 17.10.

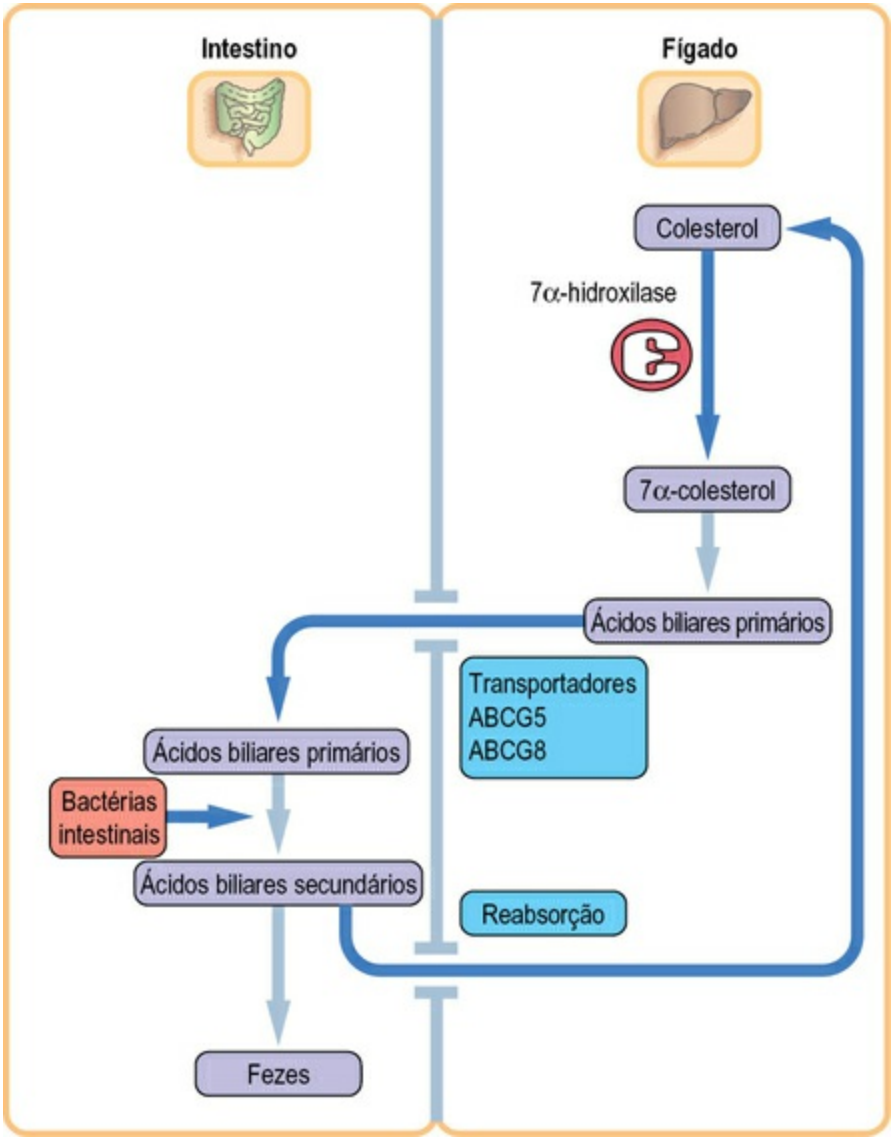


FIG. 17.10 A circulação êntero-hepática dos ácidos biliares.

O colesterol é excretado nas fezes

Aproximadamente 1 g de colesterol é eliminado do organismo por dia através das fezes: 50% deste é excretado como ácidos biliares e o restante na forma dos esteróis neutros saturados isoméricos, coprostanol (5β-) e colestanol (5α-), produzidos pela redução bacteriana da molécula de colesterol.

Colestiramina é uma resina que se liga aos ácidos biliares que tem sido utilizada para diminuir o colesterol plasmático

A colestiramina é um fármaco que interrompe a circulação êntero-hepática dos ácidos biliares. Leva ao aumento da atividade da 7α-hidroxilase e, portanto, ao aumento da síntese de ácidos biliares e também de sua excreção. Consequentemente, existe uma síntese celular de colesterol aumentada e um aumento na expressão de receptores LDL. A colestiramina foi um dos primeiros fármacos eficazes na redução do colesterol, mas agora foi suplantada pelas estatinas.

Hormônios esteroides

O colesterol é o precursor de todos os hormônios esteroides

Os mamíferos produzem vários hormônios esteroides, alguns dos quais diferem somente por uma ligação dupla ou pela orientação de um grupo hidroxila. Consequentemente, foi necessário o uso de nomenclatura sistemática para detalhar suas estruturas exatas. Existem três grupos de hormônios esteroides (Fig. 17.11). Os **corticosteroides** têm 21 átomos de carbono na estrutura básica de seu anel de pregnano. A perda dos dois átomos de carbono restantes da cadeia lateral do colesterol produz o anel androstano e o grupo de hormônios conhecidos como **androgênios.** Finalmente, a perda adicional do grupo metila ligado ao carbono 19, como parte da aromatização do anel A, resulta na estrutura do estrano encontrada nos **estrogênios.** A presença e posição de ligações duplas e a posição e orientação dos grupos funcionais no núcleo de base são características particulares de cada hormônio.

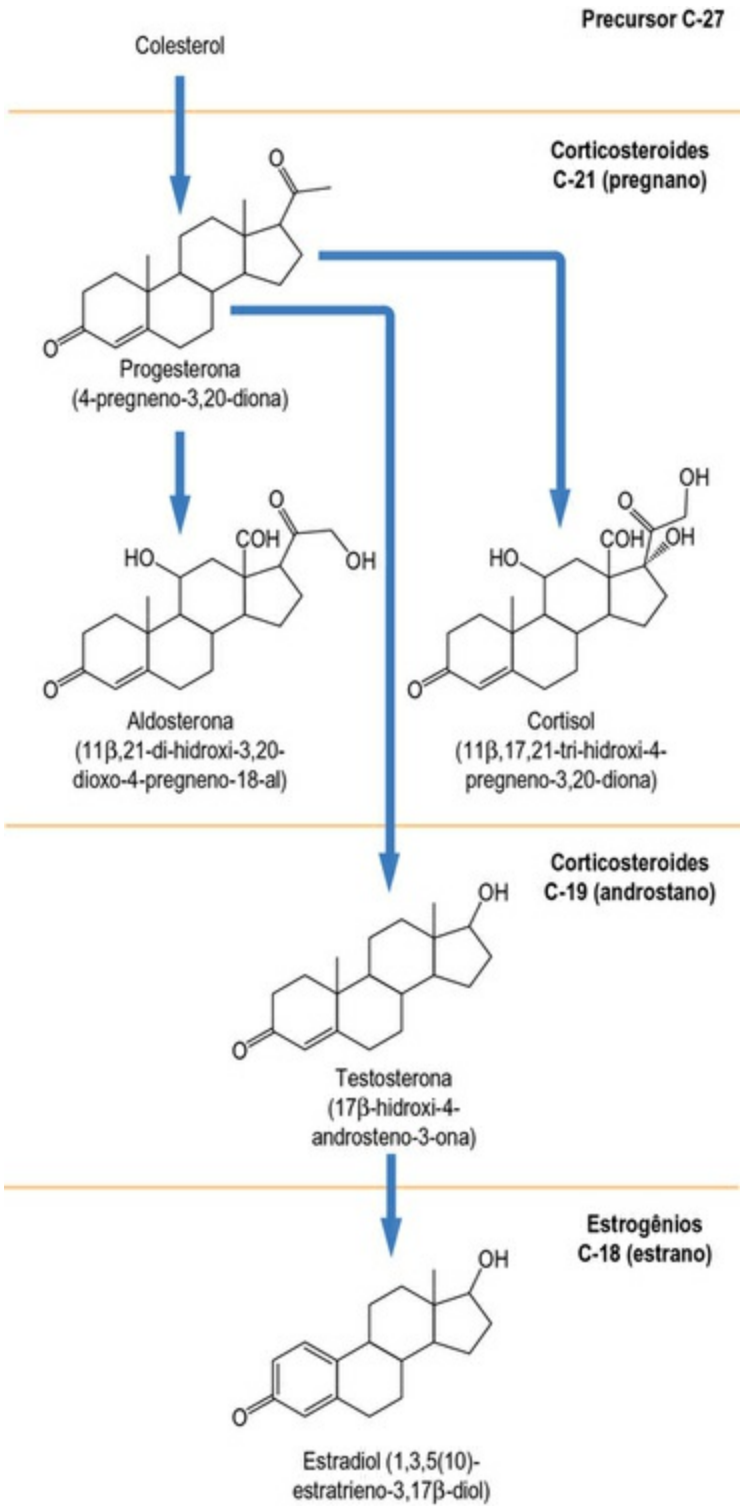


FIG. 17.11 Estrutura e nomenclatura dos hormônios esteroides humanos mais importantes. São apresentados seus nomes comuns e sistemáticos (em parêntesis). Para a numeração dos átomos em uma molécula esteroide, ver a Figura 17.1; ver também o Capítulo 39.

Quadro clínico

Mulher de 45 anos admitida por dor abdominal e vômitos: cálculos biliares

Uma mulher de 45 anos apresenta queixas de dor abdominal no quadrante superior direito e vômitos após ingestão de alimentos gordurosos. A única alteração bioquímica

foi um aumento moderado da fosfatase alcalina para 400 U/L (o limite superior do valor de referência é 260 U/L). Foi realizada uma ecografia abdominal que mostrou que a vesícula biliar continha cálculos biliares. Foi referenciada ao cirurgião.

Comentário

Os cálculos biliares ocorrem em até 20% da população nos países ocidentais. A condição resulta da formação de pedras ricas em colesterol dentro da vesícula biliar. O colesterol está presente em altas concentrações na bílis, encontrando-se solubilizado em micelas que também contêm fosfolipídios e ácidos biliares. Quando o fígado secreta bílis com uma razão colesterol:fosfolipídio maior do que 1:1, isso dificulta a solubilização de todo o colesterol nas micelas; assim, existe uma tendência para o excesso de colesterol cristalizar em torno de um núcleo insolúvel. Isto é agravado pela maior concentração da bílis na vesícula biliar, como resultado da reabsorção de água e eletrólitos.

A condição pode ser abordada conservadoramente através da redução do colesterol da dieta e pelo aumento da disponibilidade de ácidos biliares, que vão auxiliar na solubilização do colesterol na bílis e na sua excreção pelo intestino. O tratamento alternativo inclui a desintegração das pedras por ondas de choque (litotrícia) e cirurgia. **A fosfatase alcalina elevada é um marcador da colestase** (Cap. 30).

Biossíntese dos hormônios esteroides

A conversão do colesterol em hormônios esteroides ocorre somente em três órgãos: o córtex adrenal, os testículos nos homens e os ovários nas mulheres

Uma simplificação usada em termos práticos é considerar os corticosteroides como os produtos do córtex adrenal, androgênios como os produtos dos testículos e estrogênios como os produtos do ovário. Uma via simplificada da síntese dos esteroides é mostrada na Figura 17.12 (Cap. 39). No entanto, isso não é uma regra absoluta, e todos os três órgãos são capazes de secretar pequenas quantidades de esteroides pertencentes a outros grupos. Em situações patológicas, tais como um defeito na esteroidogênese ou um tumor secretor de esteroides, pode ocorrer um padrão anômalo de secreção de esteroides.

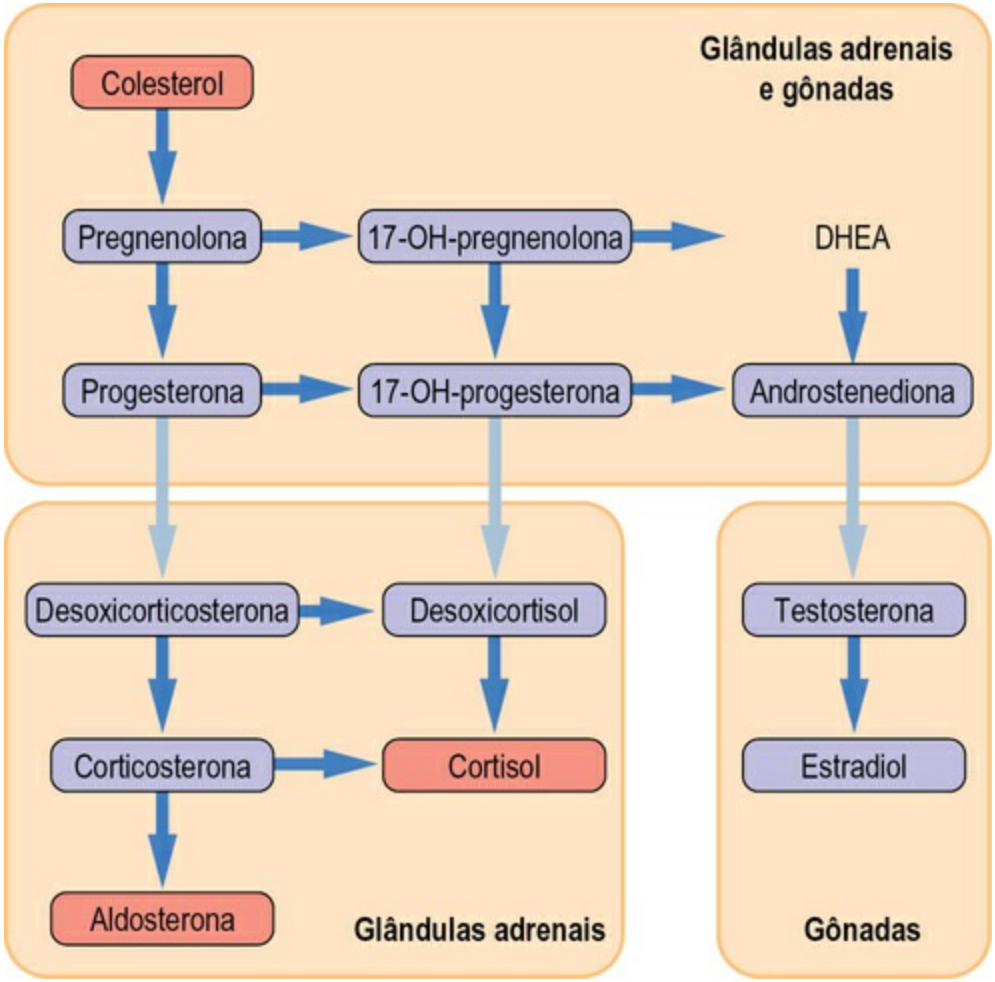


FIG. 17.12 Via biossintética de esteroides. Note como a via se ramifica a partir do colesterol, levando eventualmente à síntese de mineralocorticoides (p. ex., aldosterona), glicocorticoides (cortisol), androgênios (testosterona) e estrogênios (estradiol). DHEA, dehidroepiandrosterona.

As monoxigenases do citocromo P450 controlam a esteroidogênese

A maioria das enzimas envolvidas na conversão do colesterol em hormônios esteroides é de proteínas do citocromo P450 que requerem oxigênio e NADPH. De forma simples, esse complexo enzimático catalisa a substituição de uma ligação carbono-hidrogênio por uma ligação carbono-hidroxila; por isso o termo monoxigenase (comparar com a via da síntese do colesterol anteriormente). A hidroxilação dos átomos de carbono adjacentes é o ponto de partida para a clivagem da ligação carbono-carbono. A comparação da estrutura do colesterol (Fig. 17.2) com as estruturas dos hormônios esteroides (Fig. 17.11) demonstra que a via biossintética é em grande parte realizada pela quebra de ligações carbono-carbono e reações de hidroxilação. As enzimas envolvidas têm suas próprias nomenclaturas em que o símbolo CYP é seguido por um sufixo específico. Assim, CYP21A2 se refere à enzima que hidroxila o átomo de carbono 21.



Quadro clínico

Síndrome de smith-lemli-opitz: um defeito na 7-desidrocolesterol redutase

A síndrome apresenta-se desde o nascimento com microencefalia, raiz nasal estreita, queixo pequeno, palato arqueado alto e frequentemente fendas da linha média. Existem também, muitas vezes, defeitos do sistema nervoso central (SNC), polidactilia e, em homens, genitália ambígua.

Apesar de a via de síntese e do metabolismo do colesterol serem bem conhecidas, apenas em 1933 se identificou um defeito na 7-desidrocolesterol redutase. A patofisiologia envolve o processamento incompleto de proteínas de sinalização embriônicas (proteínas HH), resultando em variados defeitos em diferentes tecidos.

Enquanto algumas dessas crianças morrem durante a infância, as restantes, se auxiliadas na alimentação, sobrevivem com retardo mental grave (QI 20-40). A maioria também desenvolve retardo do crescimento. O tratamento envolve a administração de colesterol adicional à criança. Essa medida melhora o crescimento mas não aparenta ter benefícios no nível do SNC.

Corticosteroides

Nas glândulas adrenais, os locais de síntese de cortisol e dos androgênios adrenais são a zona fasciculata e a zona reticularis. A aldosterona é sintetizada na camada externa (zona glomerulosa)

A subestrutura celular do córtex adrenal é organizada em três camadas. As duas camadas internas (*zona fasciculata* e *zona reticularis*) são responsáveis pela síntese de cortisol, o principal **glicocorticoide,** e dos androgênios adrenais. As células da camada externa (*zona glomerulosa*) sintetizam a aldosterona, o principal **mineralocorticoide** (Cap. 23). Embora muitas das etapas sejam similares, são controladas por mecanismos muito diferentes.

A **biossíntese do cortisol** depende da estimulação pelo hormônio pituitário adrenocorticotrófico (ACTH) que se liga ao seu receptor de membrana e desencadeia um conjunto de eventos intracelulares, que resultam na hidrólise dos ésteres de colesterol armazenados em gotículas lipídicas e na ativação da enzima colesterol 20,22-desmolase, que converte o colesterol (de 27 carbonos) em pregnenolona, o primeiro composto da família pregnano (de 21 carbonos) dos corticosteroides. Essa é a etapa limitante da esteroidogênese. Subsequentemente, a conversão do cortisol necessita de uma desidrogenação-isomerização e de três reações de hidroxilação sequenciais em C-17, C-21 e C-11, catalizadas pelas enzimas CYP. A via é regulada por retroalimentação negativa pelo cortisol ao nível da secreção de ACTH (Cap. 39).

No caso da **aldosterona,** o principal estímulo para sua síntese não é o ACTH, mas a angiotensina II (Cap. 24), sendo que o potássio é um importante estímulo secundário. A angiotensina II, por ligação ao seu receptor, e o potássio atuam cooperativamente para ativar a primeira etapa da via: a conversão de colesterol em pregnenolona. A *zona glomerulosa* não possui 17α-hidroxilase, mas tem quantidades abundantes da 18-hidroxilase, que catalisa a primeira de duas etapas da reação que resulta na formação do grupo 18-aldeído da aldosterona.

Androgênios

A conversão dos corticosteroides em androgênios necessita da 17-20 liase/desmolase e de um substrato que contém o grupo 17α-hidroxila

O grupo 17*α*-hidroxila é adicionado antes da clivagem da ligação C17-C20 para produzir a estrutura do **anel androstano.** Essa enzima é abundante nas células de Leydig dos testículos e nas células da granulosa do ovário. No entanto, nesses dois tecidos a mesma etapa biossintética é controlada por dois hormônios diferentes. Nos testículos, a etapa limitante de clivagem da cadeia lateral do colesterol é estimulada pelo hormônio luteinizante (LH), enquanto no ovário é estimulada pelo hormônio folículo estimulante (FSH).

Estrogênios

A conversão dos androgênios em estrogênios envolve a remoção do grupo metila em C-19 pela 19-aromatase

O anel A passa por duas desidrogenações, produzindo o núcleo 1,3,5(10)-estratrieno característico. Esta aromatase é mais abundante nas células da granulosa do ovário, embora a enzima do tecido adiposo também possa converter alguma testosterona em estradiol. As ações biológicas dos hormônios esteroides são diversas e são mais consideradas como pertencentes ao sistema de hormônios tróficos (Cap. 39). Muitos defeitos genéticos foram identificados na estrutura das enzimas CYP. Esses defeitos levam à biossíntese anormal de esteroides e a distúrbios clínicos, tais como **hiperplasia adrenal congênita.**

Quadro de conceitos avançados

Anomalias na síntese de esteroides são reveladas por alterações no padrão de metabólitos esteroides urinários

Os metabólitos esteroides são excretados na urina principalmente como conjugados hidrossolúveis com sulfato ou ácido glicurônico. A técnica usada para sua identificação é a cromatografia gasosa — espectrometria de massa (GCMS); é muito similar ao método adotado para a identificação de esteroides anabolizantes no esporte. O primeiro passo na análise envolve a libertação enzimática dos esteroides de seus conjugados; segue-se a derivatização química para aumentar suas estabilidades e melhorar a separação, que é realizada por cromatografia de gás em colunas capilares a altas temperaturas. A detecção final é feita por fragmentação de massa: para cada metabólito esteroide, um único padrão de fragmentação iônica é obtido, o que permite sua identificação positiva e quantificação.

Mecanismo de ação dos hormônios esteroides

Os hormônios esteroides atuam via receptores nucleares

Todos os hormônios esteroides atuam pela ligação aos receptores nucleares ativados por ligando. A superfamília dos receptores hormonais também inclui receptores para o hormônio T_3 da tireoide e para as formas ativas das vitaminas A e D (Cap. 40). Adjacente ao domínio de ligação do hormônio encontra-se um domínio de ligação no DNA altamente conservado, que é caracterizado pela presença de dois *zinc fingers* (Fig. 34.3). A ligação do esteroide facilita a translocação do receptor ativado para o núcleo e sua ligação a um elemento de resposta esteroide específico nas regiões promotoras dos genes-alvo. Isso vai levar à sua transcrição (Cap. 34). A variabilidade genética da estrutura dos receptores esteroides pode estar associada a um grau variável de resistência hormonal e diversas apresentações clínicas. Veja também a discussão dos receptores esteroides no Capítulo 35.

Eliminação dos hormônios esteroides

A maioria dos hormônios é excretada na urina. Existem duas vias principais neste processo. Primeiro, a potência biológica do esteroide tem de ser removida e isso é conseguido por uma **série de reações de redução.** Segundo, a estrutura esteroide tem de se tornar hidrossolúvel: isso é conseguido pela **conjugação com um grupo glicuronídio ou sulfato,** geralmente através do grupo hidroxila em C-3. Como resultado, muitos conjugados de hormônios esteroides diferentes estão presentes na urina, alguns em altas concentrações. A análise dos esteroides urinários por cromatografia gasosa-espectrometria de massa identifica tipicamente mais de 30 desses esteroides. Suas concentrações relativas podem ser usadas para localizar defeitos específicos na via esteroidogênica (Fig. 17.13).



Quadro clínico

Recém-nascido com genitália ambígua: hiperplasia adrenal congênita

Uma criança nasce com genitália ambígua. Em um período de 48 horas a criança estava hipotensa e em sofrimento. A investigação bioquímica revelou:

- Na^+ 115 mmol/L (135-145 mmol/L)
- K^+ 7,0 mmol/L (3,5-5,0 mmol/L)
- 17-hidroxiprogesterona 550 nmol/L (limite superior do valor de referência: 50 nmol/L)

Comentário

Esta criança apresenta uma forma grave de deficiência da enzima esteroide 21-hidroxilase, a mais comum de um grupo de condições conhecido como hiperplasia adrenal congênita, que é caracterizada por defeitos na atividade de uma das enzimas da via esteroidogênica. A patologia tem uma origem genética e leva à falência na

produção de cortisol (e possivelmente de aldosterona). Isso resulta em uma reduzida retroalimentação negativa na produção de ACTH no nível da glândula pituitária. O ACTH continua a estimular a glândula adrenal a produzir esteroides a montante do bloqueio. Os esteroides acumulados incluem a **17-hidroxiprogesterona,** que é ainda metabolizada a testosterona (Figs. 17.12 e 17.13). Isso resulta na androgenização de um recém-nascido do sexo feminino. A deficiência de mineralocorticoides causa depleção renal de sal e necessita de tratamento urgente com esteroides e fluidos. O tratamento de manutenção a longo prazo com hidrocortisona e mineralocorticoides suprime a produção de ACTH e androgênios.

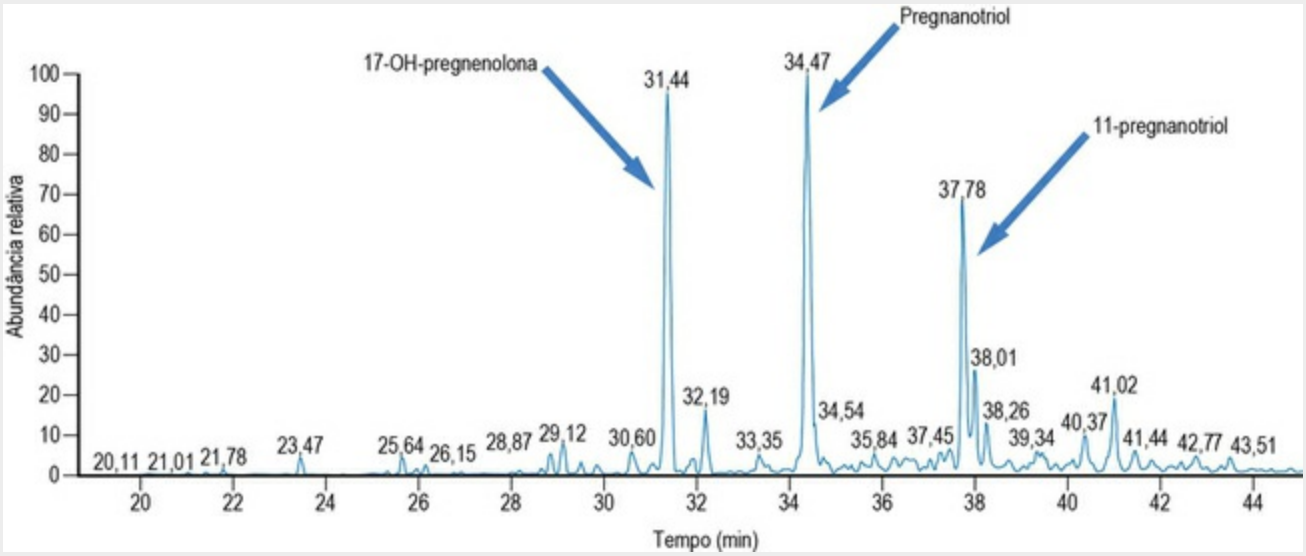


FIG. 17.13 Separação dos esteroides urinários realizada por espectrometria de massa. No laboratório clínico, a medição dos metabólitos esteroides urinários é útil no diagnóstico de vários distúrbios hereditários da síntese e do metabolismo de esteroides adrenais e de tumores produtores de esteroides. Isto é particularmente importante na identificação do local do defeito na hiperplasia adrenal congênita. Essas investigações são mais frequentemente realizadas em recém-nascidos com genitália ambígua, crianças com puberdade precoce e em pacientes com suspeita de síndrome de Cushing (Cap. 39). Este é um padrão de metabólitos urinários de esteroides obtido de um paciente com uma variante da hiperplasia adrenal congênita por deficiência da 21-hidroxilase. Os metabólitos esteroides mais proeminentes nessa patologia são a 17-hidroxipregnenolona, o pregnanotriol e o 11-oxo-pregnanotriol.
Cromatograma iônico total de um perfil de metabólito urinário esteroide de um paciente com deficiência na variante 21-hidroxilase de hiperplasia suprarrenal congênita. Nesta condição os metabólitos esteróides mais proeminentes são 17-hidroxipregnanolona, pregnanetriol e 11-oxo-preganetriol.
Eixo do X: tempo no qual os metabólitos esteroides separados cromatograficamente são detectados pelo espectômetro de massa. Eixo do Y: abundância relativa (quantidade de íons).

Uma forma menos grave dessa patologia pode ocorrer por uma deficiência parcial da enzima. Afeta mulheres jovens que se apresentam com irregularidade menstrual e hirsutismo, como consequência do excesso de androgênios adrenais.

Vitamina D_3

A vitamina D_3 (colecalciferol) também deriva do colesterol e tem um papel fundamental

no metabolismo do cálcio. As ações e o metabolismo da vitamina D são descritos no Capítulo 26.

Resumo

- O colesterol é um constituinte essencial das membranas celulares e a molécula precursora dos ácidos biliares, hormônios esteroides e vitamina D.
- O colesterol é fornecido pela dieta e também é sintetizado *de novo* a partir da acetil-CoA.
- A biossíntese de colesterol é rigorosamente regulada. A enzima limitante da via de síntese é a HMG-CoA redutase.
- A transformação do colesterol em ácidos biliares e em hormônios esteroides envolve várias reações de hidroxilação catalisadas pelas monoxigenases do citocromo P450.

Questões para aprendizagem

1. Descreva a regulação da concentração intracelular do colesterol.
2. O que são os ácidos biliares secundários e como são produzidos?
3. Discuta a circulação êntero-hepática dos ácidos biliares.
4. Discuta o papel das monoxigenases na síntese dos esteroides.

Leituras sugeridas

Charlton-Menys, V., Durrington, P. N. Human cholesterol metabolism and therapeutic molecules. *Exp Physiol*. 2007; 93:27–42.

Goldstein, J., DeBose Boyd, R. A., Brown, M. S. Protein sensors for membrane sterols. *Cell*. 2006; 124:35–46.

Janowski, B. A., Willy, P. J., Devi, T. R., et al. An oxysterol signaling pathway mediated by the nuclear receptor LXRa. *Nature*. 1996; 383:728–731.

Marcil, M., Brooks-Wilson, A., Clee, S. M., et al. Mutations in the *ABC1* gene in familial HDL deficiency with defective cholesterol efflux. *Lancet*. 1999; 354:1341–1346.

Maxfield, F. R., Van Meer, G. Cholesterol, the central lipid of mammalian cells. *Curr Opin Cell Biol*. 2010; 22:422–429.

Ory, D. S. Nuclear receptor signaling in the control of cholesterol homeostasis. *Circ Res*. 2004; 95:660–670.

Sakai, J., Rawson, R. B. The sterol regulatory element-binding protein pathway: control of lipid homeostasis through regulated intracellular transport. *Curr Opin Lipidol*. 2001; 12:261–266.

Vegiopoulos, A., Herzig, S. Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases. *Mol Cell Endocrinol*. 2007; 275:43–61.

Young, S. G., Fong, L. G. Lowering plasma cholesterol by raising LDL receptors – revisited. *N Engl J Med*. 2012; 366:1154–1155.

Sites

Cholesterol biosynthetic pathway – Rat Genome Database http://rgd.mcw.edu/rgdweb/pathway/pathwayRecord.html?acc_id=PW: 0000454

Herman, G. E., Disorders of cholesterol biosynthesis: prototypic metabolic malformation syndromes. *Hum Mol Genet*. 2003;12(suppl 1):R75–R88 doi: 10.1093/hmg/ddg072. http://hmg.oxfordjournals.org/content/12/suppl_1/R75.full

KEGG Pathway Database. Primary bile acid biosynthesis – Reference pathway. www.genome.jp/kegg/pathway/map/map00120.html

King MW: http://themedicalbiochemistrypage.org/steroid-hormones.php

CAPÍTULO 18

Metabolismo de Lipoproteínas e Aterogênese

Marek H. Dominiczak

Objetivos

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever a composição e as funções das lipoproteínas presentes no plasma: quilomícrons, lipoproteínas de densidade muito baixa, partículas remanescentes, lipoproteínas de baixa densidade e lipoproteínas de alta densidade.
- Descrever a via do transporte de combustível e a via do fluxo excedente do metabolismo de lipoproteínas.
- Descrever o transporte reverso de colesterol e a sua ligação com outras vias do metabolismo de lipoproteínas.
- Resumir os mecanismos e a regulação da concentração intracelular de colesterol, incluindo o papel dos fatores de transcrição relevantes, receptores e enzimas.
- Comentar os testes laboratoriais que avaliam o metabolismo dos lipídios e o risco cardiovascular.
- Discutir os principais componentes do processo de aterogênese — disfunção endotelial, deposição arterial de lipídios, inflamação crônica de baixo grau e trombose — assim como suas relações com o crescimento, desestabilização e ruptura da placa aterosclerótica.

Introdução

As lipoproteínas distribuem o colesterol e os triacilgliceróis (ésteres de glicerol e ácidos graxos, igualmente denominados triglicerídios: são usados ambos os termos), do intestino e fígado, para os tecidos periféricos

Estes processos estão estreitamente ligados ao metabolismo energético. Anomalias no metabolismo das lipoproteínas são fatores determinantes no desenvolvimento da aterosclerose, um processo que afeta as paredes arteriais causando doença coronária cardíaca, acidente vascular encefálico e doença arterial periférica. A doença cardiovascular aterosclerótica é atualmente a causa de morte mais frequente no mundo: a cardiopatia isquêmica e a doença cerebrovascular juntas são responsáveis por 23,6% de todas as mortes a nível mundial (OMS 2011).

Os ácidos graxos livres e os triacilgliceróis são transportados entre órgãos e tecidos

Os ácidos graxos são, em conjunto com a glicose, os principais substratos energéticos. Ao contrário da glicose, os ácidos graxos podem ser armazenados a longo prazo no tecido adiposo (na forma de triacilgliceróis, Cap. 16) para fornecer energia durante os períodos de jejum. São absorvidos do trato gastrintestinal como componentes da dieta, mas também são sintetizados endogenamente, principalmente no fígado e no intestino. Os ácidos graxos têm de ser transportados dos seus locais de absorção ou síntese para os tecidos periféricos. Enquanto os ácidos graxos livres (não esterificados) de cadeias curta e média circulam no plasma ligados à albumina, os ácidos graxos de cadeia longa são demasiado hidrofóbicos para serem transportados da mesma forma. Em vez disso, são transportados na forma de triacilgliceróis agrupados em partículas conhecidas como lipoproteínas.

Lipoproteínas

As lipoproteínas são compostas por moléculas hidrofílicas, hidrofóbicas e anfipáticas

As lipoproteínas contêm triacilgliceróis, colesterol, fosfolipídios e proteínas (apolipoproteínas). Adicionalmente transportam vitaminas lipossolúveis, tais como a vitamina A e a vitamina E. Os ésteres de colesterol e triacilgliceróis, hidrofóbicos, localizam-se no núcleo da lipoproteína; os fosfolipídios e colesterol livre, anfipáticos, juntamente com as apolipoproteínas, formam sua camada externa (Fig. 18.1). Algumas apolipoproteínas, tais como a apolipoproteína B (apoB), estão embebidas na superfície da partícula enquanto outras, tais como a apoC, estão apenas fracamente ligadas e podem ser facilmente trocadas entre partículas diferentes.

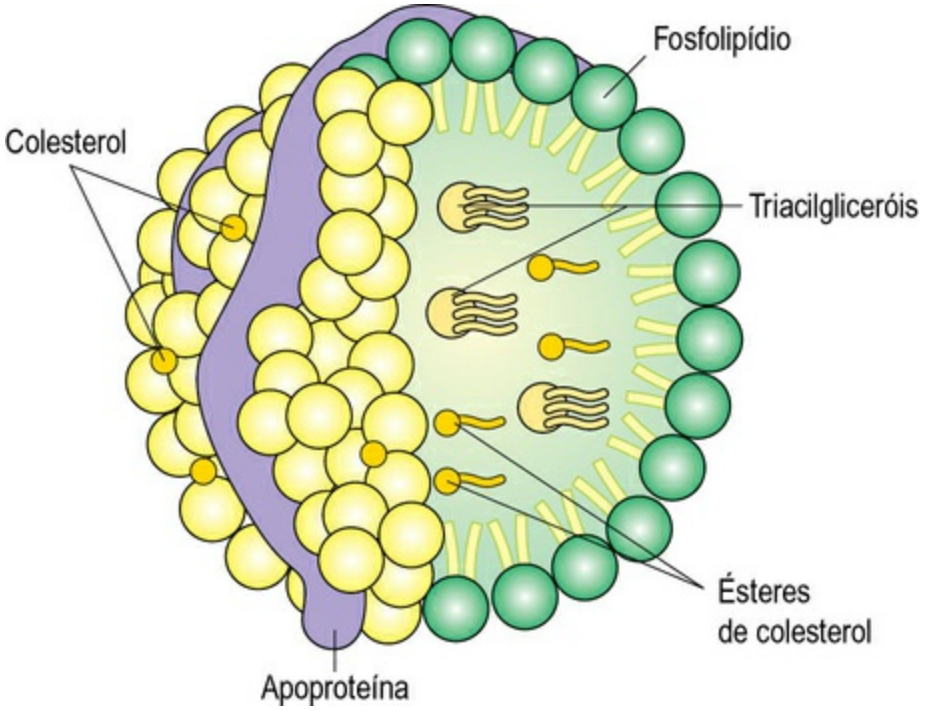


FIG. 18.1 Partícula de lipoproteína. A partícula de lipoproteína tem uma superfície externa hidrofílica e um interior hidrofóbico. A camada externa contém colesterol livre, fosfolipídios e apolipoproteínas. Os ésteres de colesterol e os triacilgliceróis se localizam no núcleo hidrofóbico da partícula.

As lipoproteínas plasmáticas são partículas de diferentes tamanhos e densidades

As lipoproteínas são classificadas com base na sua densidade, ou no conjunto de apolipoproteínas que as constituem: no plasma formam uma escala de tamanhos e densidades (Tabela 18.1). As principais classes de lipoproteínas são os quilomícrons, as lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), as partículas remanescentes (que são praticamente idênticas às lipoproteínas de densidade intermédia, IDL), as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e as lipoproteínas de alta densidade (HDL). As VLDL e as partículas remanescentes são ricas em triacilgliceróis, enquanto as LDL são pobres em triacilgliceróis e ricas em colesterol. À medida que o conteúdo de triacilgliceróis baixa, a densidade das partículas aumenta e o tamanho diminui. Assim, a densidade vai aumentando dos quilomícrons (os mais leves), passando pelas VLDL, IDL, LDL até às HDL (as mais pesadas).

Tabela 18.1

Classes de lipoproteínas

Partícula	Densidade (kg/L)	Componente principal	Apolipoproteínas*	Diâmetro (nm)
Quilomícrons	0,95	TG	B48 (A, C, E)	75-1.200
VLDL	0,95-1,006	TG	B100 (A, C, E)	30-80
IDL	1,006-1,019	TG e colesterol	B100, E	25-35
LDL	1,019-1,063	Colesterol	B100	18-25
HDL	1,063-1,210	Proteína	AI, AII (C, E)	5-12

TG, triacilglicerol (triglicerídio); VLDL, lipoproteínas de densidade muito baixa; IDL, lipoproteínas de densidade intermédia; HDL, lipoproteínas de alta densidade. Quando separadas por eletroforese, as VLDL são chamadas pré-β-lipoproteínas, as LDL, β-lipoproteínas e as HDL, α-lipoproteínas.

*As apoproteínas mais abundantes em determinada partícula lipoproteica são indicadas primeiro, com aquelas que podem ser trocadas com outras partículas entre parênteses.

Apolipoproteínas

As apolipoproteínas são os componentes proteicos das lipoproteínas. Têm um papel tanto estrutural quanto metabólico

As apolipoproteínas introduzidas na superfície das lipoproteínas determinam seu destino metabólico através de interações com receptores celulares. Também servem como reguladores da atividade de enzimas envolvidas no transporte e distribuição de lipídios. **Cada classe de lipoproteínas contém um conjunto característico de apolipoproteínas.** As principais apolipoproteínas estão listadas na Tabela 18.2. As mais importantes são apoA, apoB, apoC, apoE e apo(a).

Tabela 18.2

Estrutura e função das apolipoproteínas

Apo	Genes	Exemplos de isoformas	Síntese	Estrutura	Função	Lipoproteínas	Via r da
AI	Cromossomo 11, *cluster* gênico A1/C3/A4/A5	Seis isoformas polimórficas. Mutações: Apo AI Tangier AI Milano AI Marburg	Fígado, intestino	243 AA, 28.000 Da	Estrutural na HDL Ativador da LCAT	70% da proteína das HDL. Proteína mais abundante em HDL. Quilomícrons e VLDL	RCT
AII	Cromossomo 1		Fígado, intestino	77 AA, 17.400 Da Maioritariamente presente como dímero (massa molecular acima	Estrutural na HDL	20% da proteína das HDL. Segunda proteína mais abundante a	RCT

				correspondente à do dímero)		seguir à apoAI. Quilomícrons e VLDL	
AIV	Cromossomo 11, *cluster* gênico A1/C3/A4/A5	ApoAIV 360 (comum) ApoAIV-1, ApoAIV-2	Fígado, intestino		Metabolismo de partículas ricas em TG. Interage com CII na LPL. Ativador da LCAT	Quilomícrons, HDL, livre no plasma	Via
AV	Cromossomo 11, *cluster* gênico A1/C3/A4/A5	Múltiplas variantes	Fígado		Formação de quilomícrons e VLDL. Ativador da LPL	Quilomícrons, VLDL, HDL	Via
CIII	Cromossomo 11, *cluster* gênico A1/C3/A4/A5	Variantes que diferem no conteúdo de ácido siálico: CIII-0, CIII-1, CIII-2	Fígado, intestino	79 AA, 8.800 Da	Inibidor da LPL. Mascara ou desloca a apoE da LRP	Superfície de partículas ricas em TG: quilomícrons, VLDL remanescentes, HDL	Via
CII	Cromossomo 19		Fígado, intestino	79 AA, 8.900 Da	Ativador da LPL: sua deficiência leva à hipertrigliceridemia significativa	Quilomícrons, VLDL, HDL	Via
CI	Cromossomo 19		Fígado, intestino	57 AA	Ativador da LCAT, inibidor da LPL, inibidor da CETP. Inibe a ligação da apoE à LRP	Quilomícrons, VLDL, HDL	Via
B100	Cromossomo 2	Mais de 100 polimorfismos	Fígado	4.536 AA, 550.000 Da	Componente estrutural da VLDL, IDL e LDL. Ligando do receptor de LDL	VLDL, IDL, LDL	Via
B48	Cromossomo 2		Intestino	2.152 AA *N*-terminal da B100, 264.000 Da. 8%-10% CHO	Componente estrutural dos quilomícrons e quilomícrons remanescentes	Quilomícrons e quilomícrons remanescentes	Via
E	Cromossomo 19, *cluster* gênico E/C1/C2/C4	Três isoformas principais: E2, E3, E4. Múltiplas variantes	Fígado, intestino, cérebro, rim, baço, adrenais, e outros	299 AA, 34.200 Da	Proteína multifuncional. Ligando do receptor de LDL para as partículas de LDL e quilomícrons remanescentes. Ligando da LRP. Modula a LPL, CETP, LCAT, HTGL. Molécula antioxidante.	Quilomícrons, VLDL, remanescentes, HDL	Via

					Regulador da resposta inflamatória		
(a)	Cromossomo 6. *Linkage* com o gene do plasminogênio	Mais de 20 isoformas, dependente do número de repetições *kringle* 4 Região *Kringle* 4 é a mais variável	Fígado	Massa molecular variável: 187.000-800.000 Da Mobilidade pré-beta. Elevado conteúdo de ácido siálico		HDL-2, LDL	Pap

CHO, carboidratos; AA, aminoácidos; RCT, transporte reverso de colesterol; LRP, proteína relacionada com o receptor de LDL; LPL, lipoproteína lipase; LCAT, lecitina:colesterol aciltransferase; CETP, proteína de transferência de ésteres de colesterol; HTGL, triglicerídio lípase hepática.

Ver texto para referências.

Reproduzido, com permissão, de Dominiczak MH, Caslake MJ. Apolipoproteins: metabolic role and clinical biochemistry applications. Ann Clin Biochem 2011; 48: 498-515.

As **apolipoproteínas A** (AI e AII) estão presentes nas HDL. A Apo AI é uma proteína pequena com 243 aminoácidos sintetizada no fígado e no intestino. O gene APOA1 faz parte do complexo APOA1/C3/A4/A5. A Apo AI é a principal apolipoproteína nas partículas HDL. Ativa a lecitina:colesterol aciltransferase (LCAT: a enzima esterificadora do colesterol) e tem propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes. Clinicamente é um marcador da concentração de HDL.

A ApoII é uma proteína ainda menor (77 aminoácidos) e é maioritariamente sintetizada no fígado. Encontra-se também primariamente nas HDL. Constitui um cofator da LCAT e da proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP), e inibe a lipoproteína lipase (LPL). Não é, por rotina, medida no plasma. A apolipoproteína A se liga ao receptor *scavenger* BI.

Quadro de conceitos avançados

As lipoproteínas podem ser separadas por ultracentrifugação

Qualquer laboratório clínico usa centrifugadoras para separar os eritrócitos do soro ou plasma. Estas máquinas exercem força centrífuga moderada, 2.000-3.000 *g*. Entretanto, na bioquímica especializada em lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, são aplicadas forças centrífugas muito maiores (40.000-100.000 *g*) ao plasma para separar partículas e moléculas. Esta técnica é chamada de ultracentrifugação e é extensivamente usada nos estudos com lipídios. Quando a **força centrífuga** é aplicada a uma solução, as partículas que são mais pesadas do que o solvente sedimentam, e aquelas que são mais leves do que o solvente flutuam na superfície a uma velocidade proporcional à força centrífuga aplicada e ao tamanho da partícula. A fórmula a seguir mostra os fatores que afetam o movimento da partícula:

$$v = [d^2(\mathrm{Pp} - \mathrm{Ps}) - g] / 18\mu$$

em que v = taxa de sedimentação; d = diâmetro; P_p = densidade da partícula; Ps = densidade do solvente; μ = viscosidade do solvente, e g = força gravitacional.

Na técnica conhecida como **separação por ultracentrifugação,** o plasma é coberto com uma solução de densidade definida, como, por exemplo, 1,063 kg/L, a densidade das VLDL. Após várias horas de centrifugação (com a velocidade do rotor em torno de 40.000 rpm/min), a VLDL migra para a superfície, onde ela pode ser coletada. Outras soluções de densidades diferentes podem ser usadas para separar outras lipoproteínas. Modificações da técnica de ultracentrifugação, tal como centrifugação por gradiente de densidade, podem ser aplicadas para separar o plasma em várias "bandas" contendo diferentes frações de lipoproteínas.

A **apolipoproteína B** tem duas variantes comuns, apoB100 e apoB48. A apoB100 controla o metabolismo das LDL, enquanto a sua forma truncada, a apoB48 (Fig. 34.7) está presente nos quilomícrons. A apoB100 é uma proteína relativamente extensa com uma massa molecular de 513.000 kDa, englobando 4.509 aminoácidos. É sintetizada no fígado. Existem mais de cem variantes do gene APOB. Uma mutação no nível do resíduo aminoácido 3.500 diminui a ligação da proteína ao receptor de LDL, e é a causa da patologia conhecida como **deficiência de apoB familiar** (FDB). Só existe uma molécula de apoB por partícula lipoproteica; portanto, a medição de apoB no plasma é um bom indicador da soma das partículas de VLDL, remanescentes e LDL. A apoB100 se liga ao receptor de LDL.

A **apoB48** é a forma truncada da apoB100. A apoB100 e a apoB48 são sintetizadas a partir do mesmo gene. Durante o processo de edição do mRNA da apoB100 é introduzido um códon de terminação (a designação '48' significa que engloba 48% da sequência aminoterminal da apoB). É sintetizada pelos enterócitos e secretada pelo intestino nos quilomícrons. A apoB48 não se liga ao receptor de LDL. Sua medição é um indicador do número de quilomícrons e quilomícrons remanescentes.

A **apolipoproteína E** tem uma massa molecular de 34.200 Da e engloba 299 aminoácidos. Está presente em todas as classes de lipoproteínas. Liga-se ao receptor de LDL com maior afinidade que a apoB100. Também se liga à proteína relacionada com o receptor de LDL (LRP), o que leva à captação de partículas remanescentes pelas células. A apoE estimula a LPL, a triglicerídio lipase hepática (HTGL) e a LCAT. A apoE possui três isoformas, E2, E3 e E4. Sua síntese é controlada por três alelos principais, ε2, ε3, e ε4. A **isoforma E2** resulta de uma substituição de cisteína por arginina na posição 158 (comparativamente a E3) e tem uma menor afinidade pelos receptores. Esta situação, em homozigotos, leva a que haja uma diminuição da captação de partículas remanescentes, o que resulta na **dislipidemia familiar** (também conhecida como hiperlipidemia tipo III). As isoformas E2 e E3 ainda estão associadas a maior concentração de insulina e glicose no plasma do que a E4. Nas HDL, a apoE, em conjunto com a apoAI, contribui para a

remoção de colesterol das células. Em estudos com ratos, a inativação da LRP resultou em uma diminuição do peso corporal e também na depuração lipídica. Assim, apesar de a apoE ser ateroprotetora, poderá estar associada a aumento de peso por promover o transporte lipídico aos tecidos periféricos.

A apoE é sintetizada no cérebro pelos astrócitos e microglia: está implicada no crescimento e na reparação das células do SNC e é também anti-inflamatória e antioxidante. Verificou-se que indivíduos com o fenótipo E4 têm risco aumentado de desenvolver a forma esporádica da **doença de Alzheimer.** Por rotina não são feitas medições de apoE plasmática nos laboratórios clínicos, mas a fenotipagem e genotipagem das isoformas de apoE são usadas no diagnóstico da dislipidemia familiar.

As **apolipoproteínas C** (CI, CII e CIII) atuam como ativadores e inibidores de enzimas e são extensivamente trocadas entre as diferentes classes de lipoproteínas.

A **apolipoproteína (a)** é um componente da lipoproteína (a) (Lp(a)). A lp(a) é uma partícula híbrida que envolve a apo(a) ligada à apoB100 por uma ponte dissulfeto. É altamente polimórfica e sua massa molecular varia de 187.000 a 800.000 Da. A apo(a) possui um domínio protease e um número de sequências repetitivas de aproximadamente 80-90 aminoácidos de extensão, estabilizadas por pontes dissulfeto em uma estrutura em tripla hélice. Essas estruturas são denominadas *kringles* (devido ao nome do artigo de pastelaria dinamarquesa que tem uma forma semelhante). Uma dessas estruturas *kringle, kringle* IV, repete-se 35 vezes na sequência da apo(a). O número de repetições *kringle* IV determina a dimensão das isoformas da lipoproteína(a).

A apo(a) é sintetizada no fígado e se liga ao receptor de LDL. É estruturalmente relacionada com o plasminogênio. A concentração de lp(a) plasmática é quase exclusivamente determinada geneticamente, e é pouco influenciada por fatores relacionados com o estilo de vida. A lp(a) está modestamente associada ao risco cardiovascular. A medição de lp(a) plasmática é realizada durante a avaliação do risco cardiovascular pelo médico especialista.

Estudos clínicos demonstram que a medição das apolipoproteínas plasmáticas é um melhor preditor do risco de doença cardiovascular do que os testes lipídicos, ou seja, a medição do colesterol total e colesterol-LDL. No entanto, uma vez que os grandes estudos epidemiológicos e algoritmos terapêuticos são referenciados para medições de lipídios, a maioria dos laboratórios continua a realizar essas medições para a avaliação do risco cardiovascular.

Receptores de lipoproteínas

O receptor de LDL é regulado pela concentração intracelular de colesterol

A captação celular de lipoproteínas é mediada pela ligação das apolipoproteínas aos receptores presentes nas membranas celulares. Isso vai permitir à célula adquirir colesterol e outros lipídios. O principal receptor de lipoproteína é o receptor de LDL (receptor apoB/E). Foi descoberto por Joseph Goldstein e Michael Brown, que juntos receberam o prêmio Nobel em 1985 por este trabalho. O receptor pode se ligar quer à

apoB100, quer à apoE. A proteína do receptor madura contém 839 aminoácidos e atravessa a membrana celular (Fig. 18.2). O gene do receptor está localizado no cromossomo 19 e sua expressão é regulada pela concentração intracelular de colesterol.

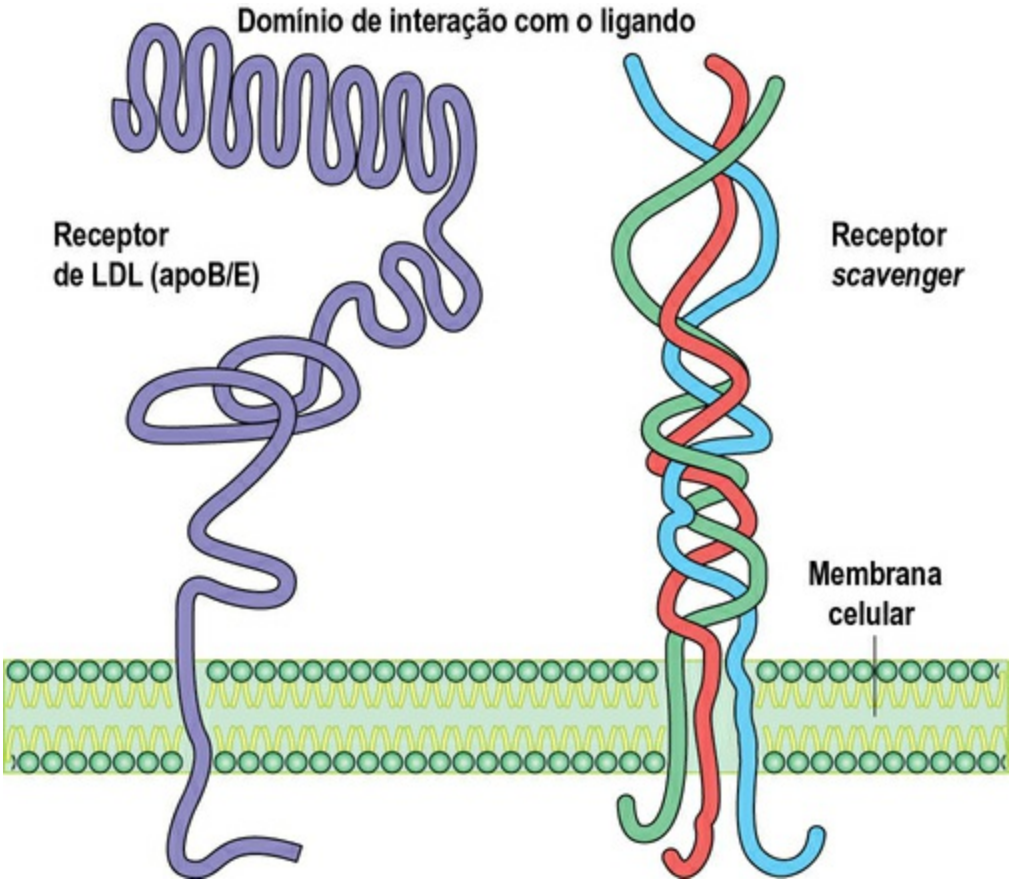


FIG. 18.2 Receptores de lipoproteína. O receptor de LDL, também conhecido como receptor de apoB/E, medeia a captação celular de partículas de LDL intactas. O receptor *scavenger* internaliza a LDL quimicamente modificada (p. ex., oxidada). Ambos os tipos de receptor atravessam as membranas celulares. A expressão do receptor de LDL é regulada pela concentração intracelular de colesterol, enquanto o receptor *scavenger* permanece não regulado. O receptor *scavenger* tipo A, ilustrado aqui, está presente em macrófagos e tem uma estrutura tipo colágeno. O receptor *scavenger* tipo BI participa no metabolismo das partículas de HDL.

Os receptores *scavenger* são inespecíficos e não são regulados

Enquanto o receptor apoB/E tem ligandos bem definidos, os receptores scavenger podem se ligar a várias moléculas diferentes. Esses receptores estão presentes nas células fagocíticas, tais como os macrófagos. Importantemente, não estão sujeitos a regulação por retroalimentação e, por isso, podem sobrecarregar a célula com qualquer molécula a que se liguem. Os receptores *scavenger* são identificados como classe A, classe B e CD36. Os receptores classe A têm uma estrutura em tripla hélice semelhante à do colágeno. Apesar de não se ligarem à LDL intacta, ligam-se facilmente à LDL modificada quimicamente (p. ex., acetilada ou oxidada) (Fig. 37.5). O receptor classe B capta partículas de HDL no fígado.

Enzimas e proteínas de transferência de lipídios

Duas hidrolases, a lipoproteína lipase (LPL) e a triglicerídio lipase hepática (HTGL), removem triacilgliceróis das partículas lipoproteicas. A LPL se encontra ligada a proteoglicanos sulfato de heparan na superfície das células endoteliais vasculares, e a HTGL está associada às membranas plasmáticas no fígado. A LPL digere os triacilgliceróis dos quilomícrons e VLDL, e libera os ácidos graxos e glicerol para as células. A HTGL atua sobre as partículas já parcialmente digeridas pela LPL e facilita a conversão de IDL em LDL (ver adiante).

A lecitina:colesterol aciltransferase (LCAT) é uma enzima glicoproteica sintetizada no fígado, que se encontra associada à HDL. A LCAT esterifica o colesterol que as HDL adquirem das células. A LCAT é ativada pela apoAI. Note que, dentro das células, o colesterol é esterificado por uma enzima diferente — acil-CoA:colesterol aciltransferase (ACAT). Existem duas isoformas da ACAT: ACAT1 está presente nos macrófagos, e a ACAT2 está presente no intestino e no fígado. Outra proteína, a proteína de transferência de ésteres de colesterol (CETP), facilita a troca de ésteres de colesterol por triacilgliceróis entre HDL, por um lado, e VLDL ou IDL, por outro lado, contribuindo para o transporte reverso de colesterol.

Vias do metabolismo de lipoproteínas

A via do transporte de combustível e a via do fluxo excedente refletem a função de transporte de combustível das lipoproteínas

A função de transporte das lipoproteínas é essencial para a distribuição aos tecidos de duas classes de compostos fundamentais: triacilgliceróis e colesterol. Os triacilgliceróis e os ácidos graxos fazem parte do metabolismo energético do organismo, enquanto o colesterol transportado pelas lipoproteínas forma um reservatório extracelular disponível para a captação celular, servindo como um suporte à capacidade de as células sintetizarem colesterol. Os principais estágios do metabolismo da lipoproteína são os seguintes:

- Formação das partículas de lipoproteína. Os quilomícrons são formados no intestino, a VLDL no fígado, e a HDL é sintetizada no fígado e no intestino.
- Transferência de lipoproteínas para as células periféricas e a liberação de triacilgliceróis/ácidos graxos das lipoproteínas para as células. Esse processo é facilitado pela LPL e pela HTGL. Como resultado, os quilomícrons e as VLDL diminuem em tamanho e se tornam partículas remanescentes.
- Ligação das partículas remanescentes aos receptores hepáticos e respectiva captação.
- Transformação dos remanescentes restantes em LDL, por hidrólise mediada pela HTGL, com subsequente ligação ao receptor apoB/E e captação celular.
- Transporte reverso de colesterol, isto é, remoção de colesterol das células pelas partículas de HDL.

A via metabólica dos quilomícrons e das VLDL, aqui denominada **via do transporte de combustível,** está intimamente relacionada com o **ciclo de alimentação-jejum** (Cap. 21) e, consequentemente, com o metabolismo energético (Fig. 18.3). A via do transporte de

combustível está, ainda, estreitamente ligada ao **transporte reverso de colesterol** através das trocas de triglicerídios e ésteres de colesterol com as partículas HDL. O final da fase de transporte de combustível (isto é, o transporte de triglicerídios às células periféricas) leva à formação de remanescentes e posteriormente de partículas LDL, que formam um reservatório extracelular de colesterol. Uma vez que a formação de LDL depende da atividade da via do transporte de combustível, o metabolismo subsequente da LDL é designado **via do fluxo excedente.**

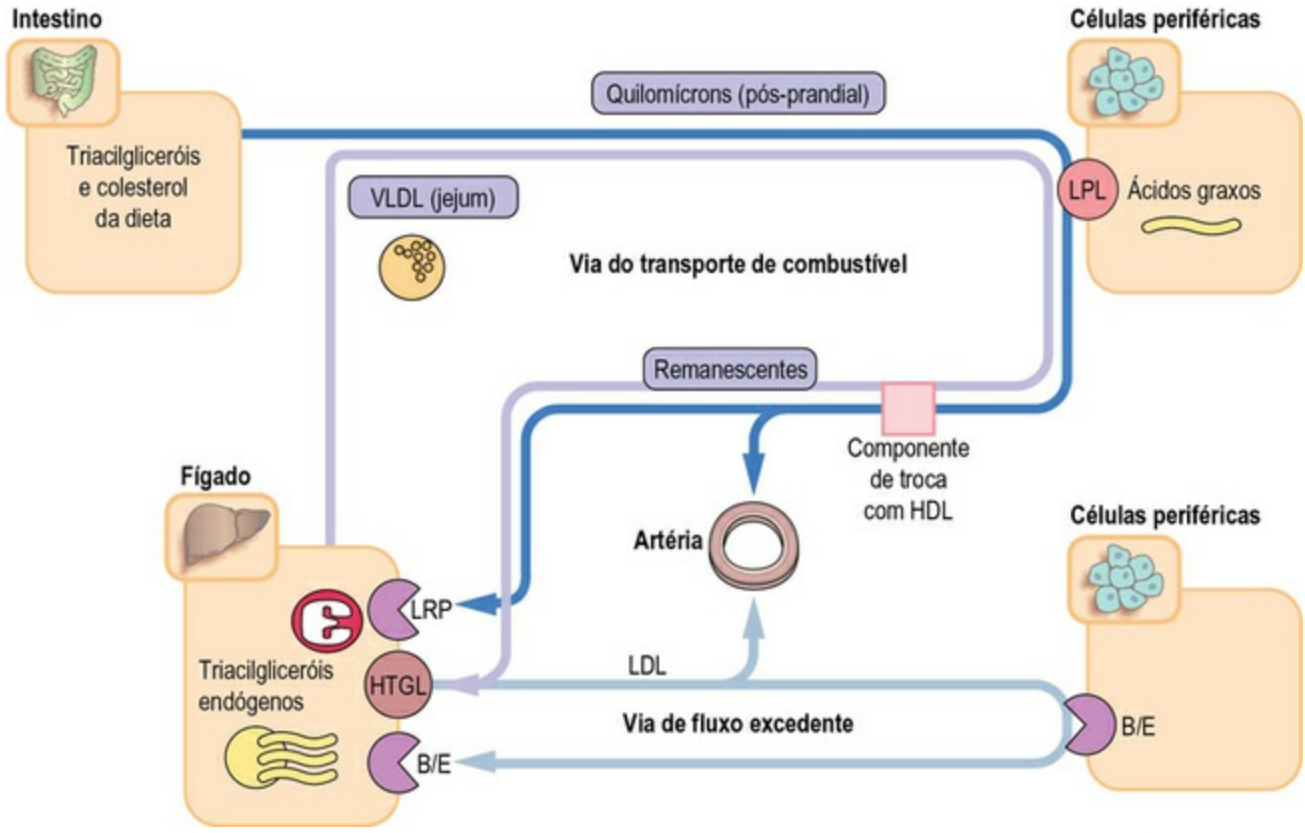


FIG. 18.3 Metabolismo das lipoproteínas: a via do transporte de combustível e a via do fluxo excedente. **A via do transporte de combustível** está ligada ao metabolismo energético e ao ciclo alimentação-jejum. No estado alimentado, os quilomícrons transportam os triglicerídios para a periferia, onde são hidrolisados pela LPL, liberando os ácidos graxos para as células. Os quilomícrons remanescentes são metabolizados no fígado, após a ligação através da apoE ao receptor de LDL, e também à LRP. As VLDL transportam combustível do fígado para os tecidos periféricos. As VLDL remanescentes, à semelhança dos quilomícrons remanescentes, retornam ao fígado. Aproximadamente 65% são captadas através da ligação ao receptor apoB/E, as restantes são hidrolisadas pela HTGL originando as LDL. As partículas ricas em triglicerídios (quilomícrons, VLDL e partículas remanescentes) adquirem ésteres de colesterol adicionais da HDL em troca de triglicerídios. Na prática clínica, o melhor indicador da atividade da via de transporte de combustível é a medição de triglicerídios plasmáticos. As partículas remanescentes também podem ser medidas principalmente no âmbito da investigação. A **via do fluxo excedente** é a via do metabolismo das LDL. As LDL são geradas a partir dos remanescentes da via do transporte de combustível, e são ricas em colesterol. As LDL são captadas pelo receptor apoB/E em resposta à diminuição da concentração intracelular de colesterol. Na prática clínica, os indicadores da atividade da via do fluxo excedente são as medições plasmáticas do colesterol total e do colesterol LDL. LPL, lipoproteína lipase; LRP, proteína relacionada com o receptor de LDL; HTGL, triglicerídio lipase hepática.

Via do transporte de combustível do metabolismo das

lipoproteínas

Os quilomícrons transportam os lipídios da dieta

Após uma refeição contendo lipídios é ativada a via que envolve a formação dos quilomícrons. Os triacilgliceróis presentes nos alimentos são quebrados pelas lipases pancreáticas e são absorvidos como monoacilgliceróis, ácidos graxos livres e glicerol livre (Cap. 10). As células intestinais (enterócitos) voltam a sintetizar os triacilgliceróis que, juntamente com os fosfolipídios e colesterol, combinam-se com a apoB48 para formar os **quilomícrons.** Estes são secretados na linfa e alcançam o plasma através do ducto torácico.

A principal apolipoproteína dos quilomícrons é a apoB48. Os quilomícrons também contêm a apoA, C e E. Após alcançarem os tecidos periféricos, seus triacilgliceróis são hidrolisados pela LPL, e os ácidos graxos entram nas células. O que resta nessa fase dos quilomícrons são partículas menores e densas, os **quilomícrons remanescentes.** Os remanescentes adquirem alguns ésteres de colesterol das HDL (ver adiante). A alteração no tamanho da partícula expõe a apoE na sua superfície, que medeia a ligação do remanescente ao receptor apoB/E e à LRP no fígado. A meia-vida dos quilomícrons no plasma é inferior a 1 hora. Normalmente os quilomícrons aparecem no plasma somente após refeições contendo gordura, dando ao plasma uma aparência leitosa (Fig. 18.3).

Atualmente existe evidência substancial de que a lipemia pós-prandial pode ter um papel na aterogênese. Fora dos períodos de jejum, a concentração plasmática de triglicerídios (refletindo um aumento das lipoproteínas remanescentes aterogênicas) tem sido relacionada com o risco de doença cardiovascular (CVD). A elevação de triglicerídios pós-prandial é particularmente importante em indivíduos com diabetes melito e resistência à insulina.

As partículas de VLDL transportam os triacilgliceróis sintetizados no fígado

Em contraste com o transporte dos lipídios da dieta pelos quilomícrons, os triacilgliceróis sintetizados no fígado são transportados pelas **VLDL.** A VLDL é produzida quer em jejum, quer no período pós-prandial. São formadas em redor de moléculas apoB100. A lipidação da apoB é facilitada pela proteína de transferência de triglicerídios microssomal (MTP). A apoB100 não utilizada é degradada por uma protease dependente de ubiquitina (Fig. 34.10). Após ser secretada no plasma, a VLDL adquire ésteres de colesterol e apolipoproteínas (apoC e apoE) da HDL. Nos tecidos periféricos, seus triacilgliceróis são hidrolisados pela LPL, de forma análoga aos quilomícrons: isso gera **VLDL remanescentes** (ou IDL). Na VLDL, as conformações da apoB100 e da apoE não permitem a ligação ao receptor apoB/E. No entanto, nas partículas remanescentes, a apoE assume uma conformação que permite tal ligação. Assim, as partículas remanescentes ou são captadas pelo fígado, ou são posteriormente hidrolisadas por outra enzima, a HTGL, que ao remover praticamente a totalidade dos triacilgliceróis as transforma em LDL. Devido à perda de triacilgliceróis, as partículas remanescentes são relativamente ricas em colesterol. Seu tamanho mais reduzido facilita a penetração no endotélio vascular, e ambas as características as tornam aterogênicas.

VLDL enriquecidas com ésteres de colesterol originam LDL pequenas e densas, altamente aterogênicas

As VLDL são enriquecidas pela CETP em ésteres de colesterol derivados de HDL, em troca de triglicerídios. Quando essas partículas enriquecidas com ésteres de colesterol são sujeitas à ação da HTGL, a remoção de triglicerídios reduz o seu tamanho de forma ainda mais marcada, originando as LDL pequenas e densas (sd), que são profundamente aterogênicas. Acredita-se que sua presença pode ser responsável por um aumento do risco de CVD em alguns indivíduos que apresentam concentrações plasmáticas de lipídios aparentemente "normais" — tal como acontece no diabetes melito. Visto que existe apenas uma molécula de apoB100 em cada partícula LDL, a presença de LDLsd pode se manifestar por **hiperapobetalipoproteinemia,** ou seja, um aumento da concentração plasmática de apoB100 com concentrações de colesterol relativamente normais. Essa condição está associada a um risco de CVD aumentado.

Via do fluxo excedente do metabolismo lipídico

As partículas de LDL são captadas pelas células pela mesma via das partículas remanescentes

As LDL são, desse modo, pobres em triacilgliceróis e relativamente ricas em colesterol. Originam-se a partir das VLDL remanescentes através da remoção da quase totalidade dos triglicerídios pela HTGL. Por conseguinte, constituem os produtos do fluxo excedente da via do transporte de combustível.

As LDL são pequenas o suficiente para penetrar na parede vascular. Contêm somente uma apolipoproteína (a apoB100) e representam o principal transportador de colesterol no plasma. Permanecem na circulação mais tempo do que as partículas remanescentes e são captadas através do receptor apoB/E, ou no nível do fígado (aproximadamente 80% das partículas), ou das células periféricas (Fig. 18.3). Sua afinidade pelo receptor é menor do que as partículas remanescentes que contêm apoE.

A síntese de colesterol intracelular e sua captação celular são interdependentes

A maioria das células sintetiza colesterol consoante suas necessidades. Contudo, quando a concentração de colesterol intracelular diminui, as células podem adquiri-lo do meio externo — e as lipoproteínas constituem um reservatório de colesterol extracelular de onde as células o podem extrair. Após internalização, o complexo LDL-receptor é digerido por enzimas lisossomais. O colesterol livre liberado é esterificado na célula e a proteína do receptor é reciclada de volta à membrana. O colesterol livre é um regulador de retroalimentação negativa de sua própria síntese. Esse processo é mediado por uma família de fatores de transcrição denominados proteínas de ligação a elemento regulador de esteróis (SREBPs). As SREBPs regulam a transcrição de genes que codificam enzimas responsáveis pela síntese do colesterol: 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A sintase e HMG-CoA redutase, mas também o gene que codifica o receptor apoB/E (Cap. 17). A depleção dos esteróis hepáticos aumenta o nível de SREBPs e, consequentemente, a

síntese de colesterol e a expressão do receptor apoB/E. Por outro lado, a concentração intracelular aumentada de colesterol inibe a via da SREBP, reduzindo a síntese de colesterol e a expressão do receptor. Essa discussão se encontra mais detalhada no Capítulo 18 (Fig. 18.4; Fig. 17.7).

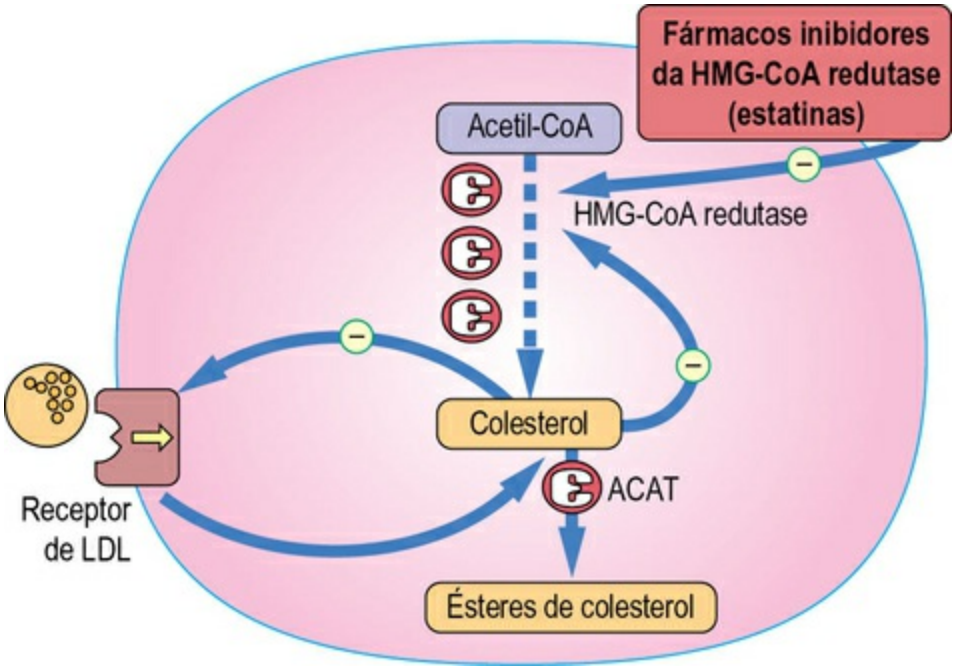


FIG. 18.4 Regulação da concentração intracelular de colesterol. O colesterol intracelular regula a atividade da HMG-CoA redutase, a enzima limitante da síntese do colesterol, e também a expressão dos receptores de LDL na membrana celular. A expressão dos genes relevantes é controlada pelos fatores de transcrição SREBP. ACAT, acil-CoA:colesterol aciltransferase. Ver também a Figura 17.7.

Via do transporte reverso de colesterol

As partículas HDL transportam colesterol das células periféricas para o fígado – isso as torna antiaterogênicas

As HDL transportam colesterol da periferia para o fígado — daí o transporte "reverso", Figura 18.5. Esse processo alivia as células da carga de colesterol e torna as HDL antiaterogênicas: uma elevada concentração plasmática de colesterol HDL (HDL-C) está associada à longevidade, e uma baixa concentração de HDL-C (e apoAI) está associada a risco aumentado de CVD.

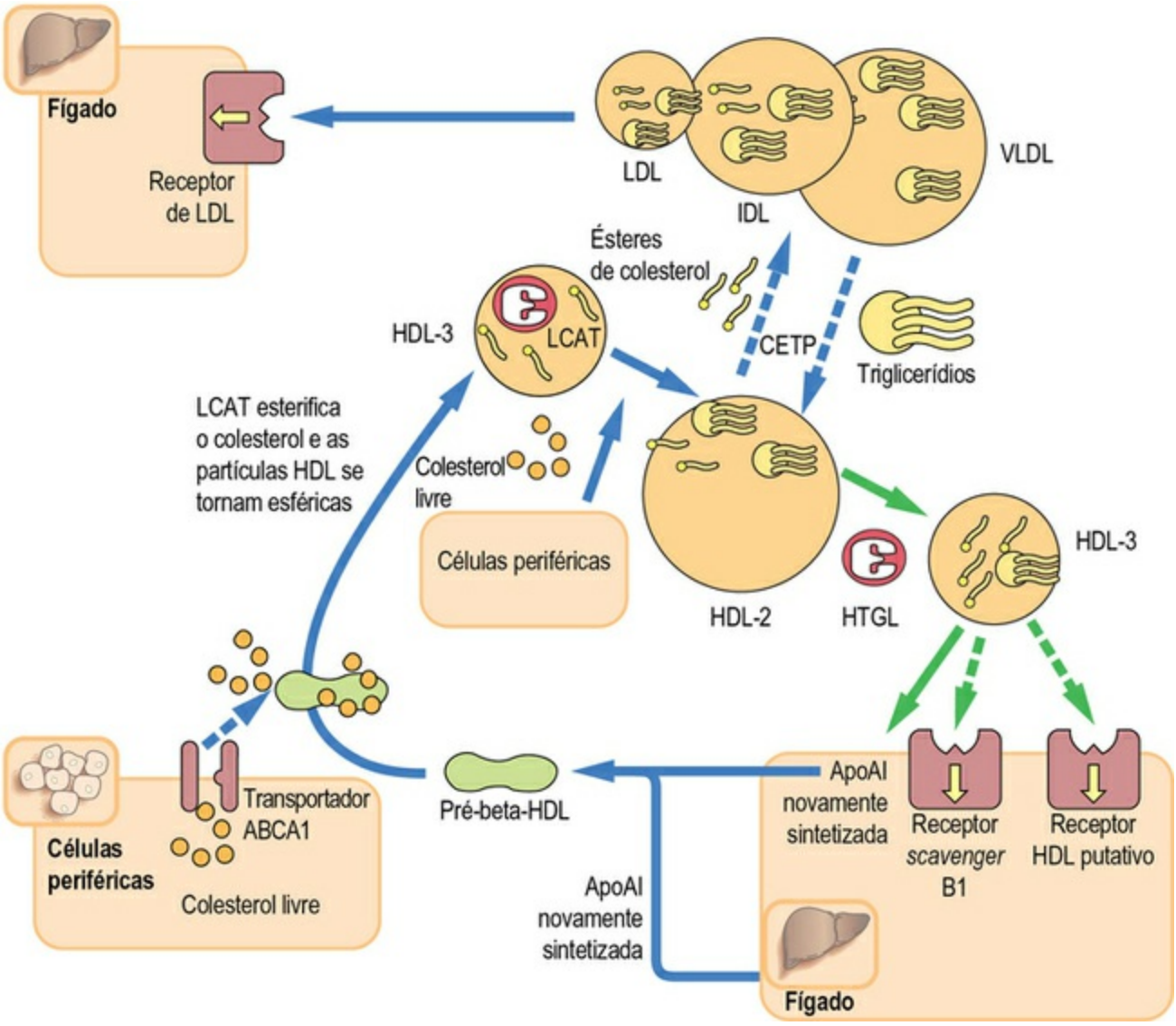


FIG. 18.5 Transporte reverso de colesterol. A HDL é formada no fígado e no intestino como uma partícula discoide. Adquire o colesterol das membranas celulares através do transportador ABCA1. A LCAT associada à HDL esterifica o colesterol adquirido. Os ésteres de colesterol se movem para dentro da partícula, tornando-a esférica (HDL-3). A CETP facilita a troca de apolipoproteínas e ésteres de colesterol entre a HDL e as lipoproteínas ricas em triglicerídios: este processo insere os ésteres de colesterol na via de transporte de combustível e é o principal modo de transporte reverso de colesterol em humanos. A HDL-3, que adquire triacilgliceróis durante a troca mediada pela CETP, aumenta mais o seu tamanho e se torna a HDL-2. Esta se liga ao receptor *scavenger* BI na membrana do hepatócito e transfere os seus ésteres de colesterol para o fígado. Após a transferência do colesterol, o tamanho da partícula de HDL diminui novamente. Parte do material redundante da superfície da partícula é liberado, formando partículas ricas em apoA1 e pobres em lipídios, pré-β-HDL, que retornam ao ciclo de remoção de colesterol. LCAT, lecitina:colesterol aciltransferase; CETP, proteína de transferência de ésteres de colesterol; HTGL, triglicerídio lipase hepática.

Quadro de conceitos avançados

Os receptores ativados por proliferador de peroxissoma controlam o metabolismo de carboidratos e lipídios

Os receptores ativados por proliferador de peroxissoma (PPARs) pertencem à superfamília de receptores nucleares que funcionam como fatores de transcrição.

Regulam os genes que controlam a homeostasia de carboidratos e lipídios — e, por conseguinte, desempenham um papel no controle do metabolismo energético. Os PPARs formam dímeros com o receptor retinoide X (RXR); e o dímero se liga subsequentemente a seus elementos de resposta nas regiões promotoras dos genes-alvo. A maioria de seus ligandos ativadores deriva do metabolismo de ácidos graxos.

A ação do PPARα está associada ao catabolismo de ácidos graxos. Estimula o catabolismo de ácidos graxos, a cetogênese e a gluconeogênese. Também está envolvido na formação de lipoproteínas e no metabolismo do colesterol. O PPARα regula a expressão do *cluster* gênico AI-CIII-AIV; isso aumenta a expressão de apoAI e apoAII e reduz a expressão do gene da apoCIII. Também aumenta a expressão da LPL.

O PPAR β/δ está envolvido no controle da proliferação e diferenciação celular, e também no catabolismo de ácidos graxos. O PPARγ influencia a homeostasia energética e a diferenciação do tecido adiposo. Sua ação melhora a sensibilidade à insulina. Tanto o PPARα quanto o PPARγ têm ações anti-inflamatórias.

Os PPARs são importantes alvos da ação de fármacos

Os fármacos hipolipemiantes frequentemente usados, derivados do ácido fíbrico (fibratos), ativam o PPARα (Cap. 20). Os fármacos antidiabéticos, tiazolidinedionas, ativam o PPARγ.

As HDL são sintetizadas no fígado e intestino. Suas apolipoproteínas principais são a apoAI e a apoAII. Também contêm apoC e apoE. É importante reter que as HDL são capazes de trocar seus componentes (apolipoproteínas, fosfolipídios, triacilgliceróis e ésteres de colesterol) com as partículas ricas em triglicerídios: quilomícrons, VLDL e partículas remanescentes.

O colesterol é removido das células pelas HDL através de moléculas transportadoras específicas

As HDL são formadas como partículas discoides, pobres em lipídios (pré-β HDL) que contêm principalmente apoAI; são parcialmente construídas a partir do excesso de fosfolipídios perdido das VLDL durante sua hidrólise pela LPL. Estas partículas de HDL nascentes aceitam o colesterol das células através da ação de uma proteína de membrana conhecida como transportador *ATP-binding cassette* A1 (ABCA1; Cap. 8). O ABCA1 usa ATP como fonte de energia e é o controlador limitante da taxa de efluxo do colesterol livre para apoAI. Outro transportador *ATP-binding cassette*, ABCG1, transfere colesterol das células para partículas de HDL maduras. Outros ainda, conhecidos como ABCG5 e ABCG8, estão presentes nas membranas apicais dos hepatócitos onde controlam o movimento do colesterol para a bílis (Cap. 17).

A transferência de ésteres de colesterol entre HDL e partículas ricas em triglicerídios é importante em seres humanos

O colesterol livre adquirido pelas HDL nascentes é esterificado pela LCAT. Os ésteres de colesterol se movem para o interior da partícula de HDL, que expande e passa a assumir

uma forma esférica — conhecida como HDL-3. Seguidamente, através da ação da CETP, são transferidos alguns ésteres de colesterol para as lipoproteínas ricas em triglicerídios, em troca destes mesmos triglicerídios. A aquisição dos triglicerídios expande ainda mais a partícula — torna-se agora HDL-2. Repare que a transferência mediada pela CETP reinsere o colesterol na via do transporte de combustível, canalizando-o de volta ao fígado. Isto é importante porque esse processo de troca parece ser a **principal via de transporte reverso de colesterol em seres humanos.**

O colesterol restante na HDL-2 vai ser também transportado para o fígado. A HDL-2 se liga aos receptores *scavenger* classe B no fígado e transfere o colesterol para a membrana celular. A partícula se liga ao receptor mas não é captada pelas células. A transferência de colesterol reduz novamente o seu tamanho. As partes, agora redundantes, de seu "invólucro" se tornam a HDL nascente que está preparada para o próximo ciclo de transporte. A HDL-2 pode ser ainda adicionalmente digerida pela HTGL, dando origem a uma subclasse de HDL-3 pequenas.

A HDL também exerce ações antiaterogênicas além do transporte reverso de colesterol

Além de sua participação no transporte reverso de colesterol, a HDL tem outras propriedades ateroprotetoras. Por exemplo, elas ativam a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) promovendo a produção de óxido nítrico (NO). Também têm propriedades anti-inflamatórias e ações de limpeza de radicais livres (espécies reativas de oxigênio, ROS), promovem a integridade da camada endotelial e previnem a adesão de células ao endotélio, a agregação plaquetária e a trombose.

Dislipidemias

Defeitos no metabolismo das lipoproteínas levam a patologias conhecidas como dislipidemias, igualmente chamadas, apesar de menos corretamente, hiperlipidemias. Sua classificação original, agora desatualizada, em tipos de I a V foi baseada no comportamento eletroforético das lipoproteínas (Tabela 18.3). Atualmente a classificação eletroforética foi suplantada pela genética (Tabela 18.4). Outra classificação, fenotípica, frequentemente usada clinicamente divide as dislipidemias em hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia e dislipidemia mista. Uma revisão das anomalias do metabolismo das lipoproteínas é mostrada na Figura 18.6.

Tabela 18.3

Classificação fenotípica das dislipidemias

Tipo de dislipidemia (Fredrickson)	Fração eletroforética aumentada (lipoproteína)	Colesterol aumentado	Triglicerídios aumentados
I	Quilomícrons	Sim	Sim
IIa	β (LDL)	Sim	Não
IIb	Pré-β e β (VLDL e LDL)	Sim	Sim
III	"Banda β" larga (IDL)	Sim	Sim
IV	Pré-β (VLDL)	Não	Sim
V	Pré-β (VLDL) mais quilomícrons	Sim	Sim

Na eletroforese as α-lipoproteínas (HDL) migram mais longinquamente em direção ao ânodo (eletrodo (+)), seguidas das pré-β-lipoproteínas (VLDL) e das β-lipoproteínas (LDL). Os quilomícrons permanecem na extremidade catódica, na origem da tira eletroforética.

Esta é a classificação desenvolvida por Donald Fredrickson e adotada pela OMS; baseia-se na separação eletroforética das lipoproteínas séricas. Tem sido largamente substituída pela classificação genética. As dislipidemias também podem simplesmente ser classificadas como hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia ou dislipidemia mista.

Tabela 18.4

As dislipidemias genéticas mais importantes

Dislipidemia	Frequência/herança	Defeito	Padrão lipídico plasmático	Risco cardiovascular aumentado
Hipercolesterolemia familiar	1:500 Autossômico dominante	Deficiência do receptor de LDL ou prejuízo funcional	Hipercolesterolemia ou hiperlipidemia mista (IIa ou IIb)	Sim
Hiperlipidemia combinada familiar	1:50 Autossômico dominante	Sobreprodução de apoB100	Hipercolesterolemia ou hiperlipidemia mista (IIa ou IIb) É característico padrões variáveis em diferentes membros da família	Sim
Disbetalipoproteinemia familiar (hiperlipidemia tipo III)	1:5.000 Autossômico recessivo	Presença do genótipo APO E2/E2. Defeito na ligação de remanescentes ao receptor de LDL	Hiperlipidemia mista	Sim

Hiperlipidemia mista: aumento quer do colesterol quer de triglicerídios plasmáticos.

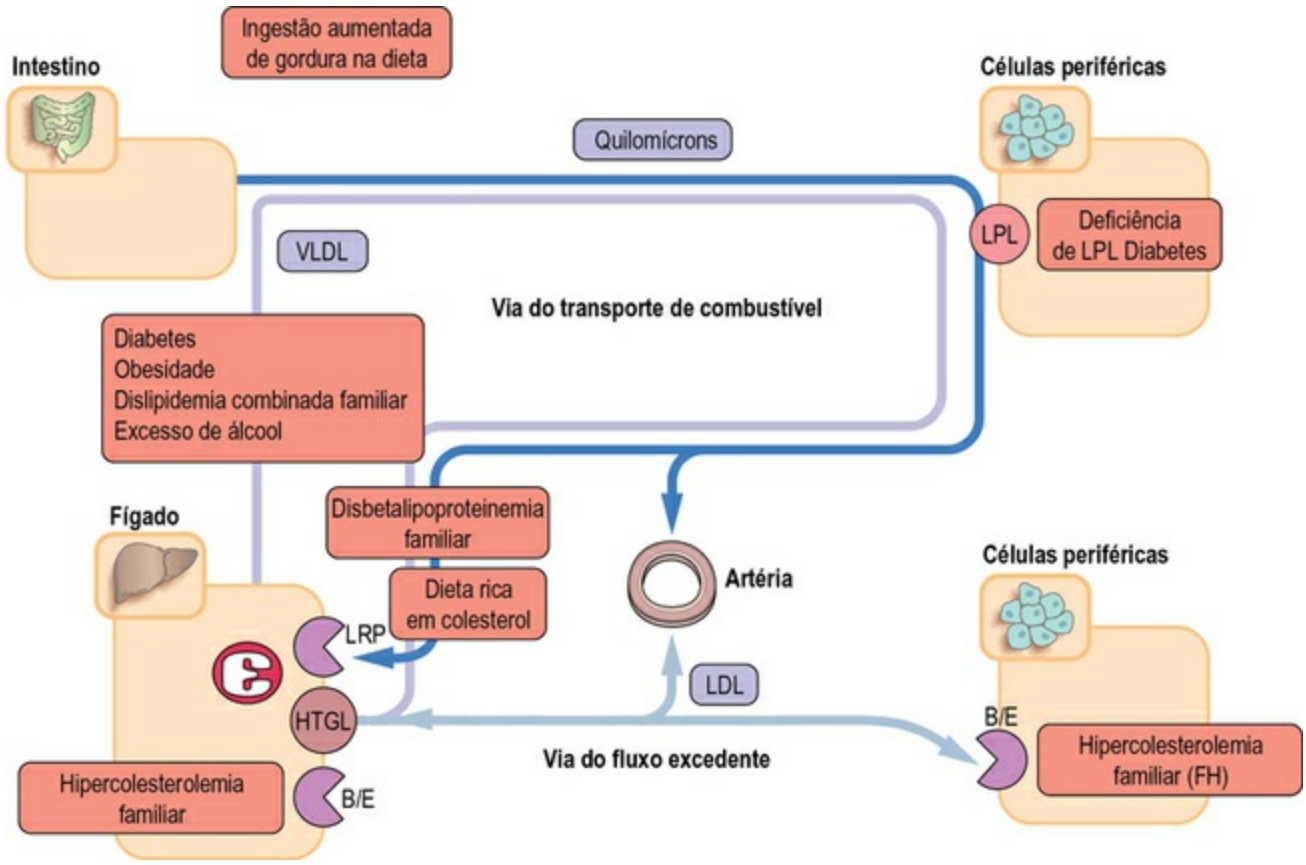


FIG. 18.6 Visão geral das anomalias do metabolismo das lipoproteínas. Compare com a Figura 18.3. **Patologias que afetam primariamente a via do transporte de combustível:** a via do transporte de combustível é afetada por ingestão excessiva de gordura na dieta, obesidade e diabetes. A deficiência de LPL causa elevações extremas dos quilomícrons e VLDL. É importante reter que nesta via as concentrações de lipoproteínas variam com o ciclo alimentação-jejum. As concentrações dos remanescentes aterogênicos aumentam pós-prandialmente e podem ser importantes na aterogênese. A disbetalipoproteinemia familiar leva a um aumento da concentração de remanescentes devido à deficiente captação celular causada por uma mutação na apoE. **Patologias que afetam primariamente a via do fluxo excedente:** a concentração de LDL plasmática pode ser afetada por sua produção aumentada (por digestão de VLDL remanescentes mediada pela HTGL) pela via do transporte de combustível, ou por deficiente captação celular. O defeito mais importante é a captação prejudicada de LDL devido a mutações no gene do receptor apoB/E, que causa a hipercolesterolemia familiar (FH). Na FH é afetada primariamente a via do fluxo excedente, aumentando a concentração plasmática de LDL. Note que, no entanto, a captação de remanescentes também se encontra prejudicada. **Patologias que afetam ambas as vias:** a hiperlipidemia combinada familiar afeta ambas as vias por causa da síntese aumentada de VLDL e consequente aumento da formação de LDL. Similarmente, a dieta rica em gordura afeta ambas as vias.

Patologias que afetam a via do transporte de combustível

Fluxo aumentado na via do transporte de combustível ocorre na obesidade e no diabetes melito

O fluxo aumentado através da via do transporte de combustível ocorre mais frequentemente devido à síntese aumentada de VLDL. Esta situação acontece em duas condições muito comuns, obesidade e diabetes melito. A dislipidemia diabética afeta ainda a via do transporte reverso de colesterol; um padrão frequente encontrado no diabetes inclui um aumento na concentração plasmática de triglicerídios combinado com

uma diminuição no HDL-C. No diabetes, a via do fluxo excedente permanece relativamente inalterada: os pacientes com frequência têm a concentração de colesterol LDL (LDL-C) normal. No entanto, os pacientes diabéticos parecem formar as LDL pequenas e densas; logo, as LDL de diabéticos, apesar de não estarem aumentadas, podem ser mais aterogênicas que as partículas de não diabéticos. É importante notar que a perda de peso reduz a atividade dessa via. A combinação de VLDL remanescentes aumentadas (resultando em hipertrigliceridemia ligeira), LDLsd aumentadas e HDL baixa, é por vezes referida como "tríade aterogênica".

Outra condição comum que causa aumento na produção de VLDL é o abuso de álcool. Entretanto, em contraste com o diabetes, ao mesmo tempo que aumenta a VLDL também aumenta a concentração de HDL.

A deficiência de LDL leva à hipertrigliceridemia extrema

A via do transporte de combustível também se torna sobrecarregada se a hidrólise dos quilomícrons ou da VLDL for ineficiente. Isso também pode ocorrer no diabetes, em que a ausência de insulina inibe a LPL, e contribui para o desenvolvimento de hipertrigliceridemia. Um distúrbio muito raro, a deficiência da LPL, resulta em concentrações extremamente altas de triglicerídios plasmáticos, que podem exceder os 100 mmol/L (8.850 mg/dL).

O comprometimento do metabolismo das partículas remanescentes leva à disbetalipoproteinemia familiar

Esta condição rara, mas importante, que afeta a última etapa da via do transporte de combustível, a captação de remanescentes, é uma patologia herdada conhecida como disbetalipoproteinemia familiar. É causada pela mutação da apolipoproteína "condutora" das partículas remanescentes, a apoE (presença do fenótipo E2/E2) que diminui sua ligação ao receptor apoB/E. A disbetalipoproteinemia familiar está associada à doença cardiovascular prematura e era previamente conhecida como hiperlipidemia tipo III.

Patologias que afetam a via do fluxo excedente

Concentração elevada de LDL-C pode ser resultado de sua sobreprodução ou de deficiente captação celular

Anomalias na via do fluxo excedente levam à hipercolesterolemias, sendo a mais importante a **hipercolesterolemia familiar (FH)**. A FH se caracteriza por um defeito na captação celular de LDL devido a anomalias (ou ausência) do receptor de apoB/E, devido a mutações nos genes relevantes (ver Quadro a seguir). Pacientes com FH têm uma concentração elevada de LDL e alguns apresentam xantomas tendinosos — depósitos de ésteres de colesterol nos tendões de Aquiles e tendões das mãos. A FH está associada à doença cardiovascular prematura e a uma história familiar proeminente de doença coronária precoce. A deficiência de apolipoproteína B familiar (FDB) é, por outro lado, causada por uma mutação na molécula de apoB100 que impede sua ligação ao receptor.

Um aumento na LDL também pode ser secundário à síntese aumentada de VLDL (de acordo com o conceito de "fluxo excedente"), e consequente transformação aumentada dos remanescentes em LDL. Isso ocorre na dislipidemia combinada familiar. Finalmente, a ingestão de gorduras saturadas na dieta também afeta a concentração de LDL. Uma dieta pobre em gordura pode reduzir a LDL, e a concentração plasmática de colesterol, em 10-15%.

Observe que a maioria das hipercolesterolemias ligeiras a moderadas encontradas na prática clínica são poligênicas (Quadro da página a seguir).



Quadro clínico

Dislipidemias determinadas geneticamente

Nos países industrializados, aproximadamente 30% das pessoas têm concentrações plasmáticas de colesterol indesejavelmente elevadas. A dislipidemia mais frequente (conhecida como **hipercolesterolemia comum**) é poligênica e é o resultado da combinação de fatores genéticos e ambientais. Além disso, existem doenças mais raras com uma estrutura genética definida. As mais importantes são mencionadas a seguir.

A **hipercolesterolemia familiar** é uma doença monogênica causada por uma mutação no gene que codifica o receptor ApoB/E e afeta a via do fluxo excedente. A captação celular de partículas remanescentes e de LDL ou está comprometida (heterozigóticos FH) ou está completamente inibida (homozigóticos FH, muito raro). Outras mutações perturbam a reciclagem do receptor de LDL para a membrana plasmática. Pacientes com FH têm concentrações plasmáticas de colesterol total e de LDL-C muito elevadas. A forma de hereditariedade é autossômica dominante, pelo que normalmente existe uma história familiar proeminente de doença cardíaca precoce. Alguns pacientes desenvolvem depósitos lipídicos nos tendões das mãos e do joelho e particularmente nos tendões de Aquiles: são conhecidos como xantelomas e são diagnósticos da doença. A hipercolesterolemia familiar comporta um elevado risco de doença cardiovascular precoce (nota: infarto prematuro é definido como um que ocorra em um homem com idade inferior a 55 anos ou em uma mulher com idade inferior a 65).

Uma mutação no gene que codifica a proteína 6 relacionada com o receptor de LDL também tem sido ligada à doença coronária precoce, demonstrando hereditariedade autossômica dominante.

A **hiperlipidemia familiar combinada** é caracterizada por uma produção excessiva de apoB100 em vez de um comprometimento da depuração mediada por receptores. Existe uma produção aumentada de VLDL e, consequentemente, uma produção aumentada de LDL: outra vez, a via de transporte de combustível e a via do fluxo excedente são afetadas. Essa dislipidemia se apresenta com padrões variáveis de lipídios plasmáticos (ou com hipercolesterolemia exclusiva ou hipercolesterolemia com hipertrigliceridemia). A hiperlipidemia familiar combinada é uma causa relativamente comum de infartos do miocárdio precoces.

A **disbetalipoproteinemia familiar** afeta primariamente a via do transporte de combustível e é causada por uma mutação no gene apoE, originando uma isoforma da apoE com baixa afinidade pelo receptor apoB/E. Nesta doença, os remanescentes se acumulam e ocorre um aumento nas concentrações plasmáticas de colesterol e triglicerídios. Xantelomas palmares característicos estão presentes. A disbetalipoproteinemia familiar está associada à doença coronária precoce.

A **deficiência na lipoproteina lipase** é uma dislipidemia muito rara que afeta a via do transporte de combustível e é causada pela deficiência da LPL. A acumulação de quilomícrons e de VLDL leva a concentrações plasmáticas de triacilglicerol muito elevadas. Os sinais clínicos incluem xantomas cutâneos tipo exantema característicos. O risco associado à deficiência de LPL é principalmente de inflamação pancreática (pancreatite, Cap. 9) causada pelas concentrações de triacilglicerol muito elevadas.

Abetalipoproteinemia. Mutações no gene que codifica a apoB podem também levar a VLDL baixas e, consequentemente, a concentrações de LDL baixas. Uma dislipidemia muito rara conhecida como abetalipoproteinemia está associada à mutação do gene que codifica a proteína de transferência microssomal (MTP), envolvida na montagem celular das VLDL.



Quadro clínico

O diagnóstico de hipercolesterolemia familiar

Os critérios de Simon Broome para o diagnóstico de hipercolesterolemia familiar, usados na Grã-Bretanha são:

- Colesterol plasmático total acima de 7,5 mmol/L (290 mg/dL) ou colesterol-LDL acima de 4,9 mmol/L (189 mg/dL) em um adulto.
- Colesterol acima de 4 mmol/L (154 mg/dL) em uma criança com menos de 16 anos.

Mais:

- Xantomas tendinosos em um paciente ou em um parente de primeiro grau (pais, irmãos, filhos) ou em um parente de segundo grau (avós, tios).

Ou:

- Evidência baseada em DNA de uma mutação no receptor de LDL, de uma apoB100 defeituosa familiar ou de uma mutação no gene PSK9.

Atualmente, a avaliação genética básica para apoiar o diagnóstico de FH envolve a procura de várias mutações do gene do receptor de LDL: uma delas é a sequência 1637G > A, que resulta na substituição de uma glicina por um aspartato (Gly546Asp). Essa substituição resulta na redução da atividade do receptor de LDL. Outra mutação do gene APOB, Arg3527Gln, foi encontrada em 5%-7% dos pacientes com FH, bem como uma mutação menos frequente do gene PCSK9, Asp374Tyr.

Quadro clínico

A dislipidemia é comum no diabetes melito

O senhor B tem 67 anos, é obeso (IMC 28 kg/m^2), tem diabetes tipo 2 e apresenta hipertensão moderada. Na consulta, sua concentração de colesterol era de 6,9 mmol/L (265 mg/dL), de triglicerídios de 1,9 mmol/L (173 mg/dL) e de colesterol-HDL de 0,9 mmol/L (35 mg/dL). Sua glicemia em jejum era de 8,5 mmol/L (153 mg/dL) e sua hemoglobina A_{1C} (HbA_{1c}) era de 31 mmol/mol (valor desejável é abaixo de 48 mmol/L). O paciente estava sendo tratado com dieta e metformina, que aumenta a sensibilidade à insulina e diminui a concentração de glicose no sangue.

Comentário

O diabetes comporta um risco 2 a 3 vezes maior de doença cardíaca coronária. O diabetes desse paciente estava bem controlado (julgando pela concentração de HbA_{1c}) mas seu nível de colesterol se manteve alto, pelo que necessitou de tratamento com fármacos para reduzir os lipídios. A baixa concentração de colesterol-HDL é relativamente comum no diabetes tipo 2. Foi prescrita uma estatina ao paciente, além da metformina. A pressão arterial respondeu ao tratamento com um inibidor da enzima conversora da angiotensina (Cap. 20).

Quadro clínico

A hipercolesterolemia familiar é causa de infarto do miocárdio precoce

Um homem de 32 anos, fumador pesado, desenvolveu subitamente uma dor esmagadora no peito. Foi admitido no departamento de acidentes. O infarto do miocárdio foi confirmado por alterações no ECG e por uma concentração elevada da troponina cardíaca. À observação o paciente tinha xantomas nos tendões das mãos e tendões de Aquiles espessados. Existia uma história familiar forte de doença cardíaca coronária (o pai tinha feito um *bypass* coronário aos 40 anos e o avô paterno tinha morrido de infarto do miocárdio aos 50 anos). Seu colesterol era de 10,0 mmol/L (390 mg/dL), os triglicerídios de 2 mmol/L (182 mg/dL) e o colesterol-HDL de 1,0 mmol/L (38 mg/dL).

Comentário

Este paciente tem **hipercolesterolemia familiar (FH),** uma doença autossômica dominante caracterizada por um número diminuído de receptores de LDL. A FH comporta um elevado **risco de doença coronária precoce,** e os heterozigóticos podem sofrer infartos tão cedo como na 3ª ou 4ª décadas de vida. A frequência de homozigóticos FH nas populações ocidentais é de aproximadamente 1:500. A este paciente foi imediatamente administrado tratamento trombolítico intravenoso. Subsequentemente, foi submetido a *bypass* coronário e tratado com fármacos que

reduzem os lipídios. Sua concentração de colesterol diminuiu para 4,8 mmol/L (185 mg/dL), os triglicerídios para 1,7 mmol/L, com o colesterol-HDL a aumentar para 1,1 mmol/L (42 mg/dL).

Nota: Um infarto do miocárdio precoce é o que ocorre em um homem abaixo dos 55 anos ou em uma mulher abaixo dos 65 anos.

Patologias que afetam o transporte reverso de colesterol

Várias mutações raras levam à diminuição da concentração de HDL

Colesterol-HDL baixo pode resultar de mutações nos genes que codificam a apoA1, o transportador ABCA1 e o LCAT. Pacientes com deficiência na apoA1 se apresentam com HDL plasmático baixo acompanhado por xantelasmas, opacidade da córnea e arteriosclerose. Os heterozigóticos ocorrem em 1% da população. Desenvolvem também amiloidose.

Indivíduos com mutações no ABCA1, além de HDL plasmático baixo, têm amígdalas grandes de coloração alaranjada, hepatoesplenomegalia, neuropatia periférica e trombocitopenia. Este quadro é conhecido como doença de Tangier.

A deficiência do LCAT é conhecida como doença do olho de peixe. É caracterizada por deficiência de HDL e também por opacidade da córnea, nefropatia e anemia hemolítica. Em contraste, a deficiência do CETP leva a concentrações altas de HDL.



Quadro de conceitos avançados

A concentração plasmática de proteína c-reativa reflete a inflamação de baixo grau crônica associada à aterogênese

A reação inflamatória associada à infecção pode ser detectada pela medição da concentração plasmática de proteína C-reativa (CRP), uma proteína sintetizada no fígado (mas também nas VSMC e no endotélio) em resposta à estimulação por citocinas pró-inflamatórias. Seu nome vem de sua ligação ao polissacarídio capsular (C) de bactérias como o *S. pneumoniae,* que medeia sua eliminação.

Pequenos aumentos na concentração de CRP, que requerem um método analítico altamente sensível (hs) capaz de detectar concentrações de CRP inferiores a 10 mg/L, podem refletir processos inflamatórios crônicos nas paredes vasculares. Estudos epidemiológicos demonstraram uma associação entre a concentração de hsCRP e eventos cardiovasculares. É de salientar que esta associação é independente da ligação entre a concentração plasmática de colesterol e a doença coronária. Concentrações plasmáticas aumentadas de outras moléculas pró-inflamatórias, como a **interleucina-6** (IL-6) e o **amiloide A sérico,** também foram ligadas à doença coronária. A medição da hsCRP melhora o valor preditivo do colesterol-LDL e sua utilização é sugerida para afinar a avaliação do risco cardiovascular. Foi recentemente observado que adicionar CRP ou fibrinogênio ao painel de fatores de risco convencional melhora a avaliação do

risco.

É sugerido que CRP <1 mg/dL significa risco CVD baixo, enquanto CRP >3 mg/dL está associado a risco elevado de doença coronária.

Aterosclerose, aterogênese e aterotrombose

A **aterosclerose** é um processo que leva ao estreitamento ou à oclusão completa súbita do lúmen arterial. O estreitamento se deve a placas ateroscleróticas de crescimento lento, enquanto a oclusão completa súbita é causada pelo trombo que se forma em uma placa que sofreu ruptura. A oclusão completa pode causar **infarto do miocárdio** (se o bloqueio for em uma artéria coronária), **acidente vascular encefálico** (bloqueio em uma artéria que irriga o cérebro) ou **doença vascular periférica** (bloqueio nas artérias do membro inferior; leva a uma dor característica que ocorre durante o caminhar e que alivia rapidamente quando a pessoa para, conhecida como claudicação intermitente). O desenvolvimento de uma placa aterosclerótica é designado **aterogênese**. O termo **aterotrombose** é, por vezes, utilizado para enfatizar as relações entre os processos de crescimento da placa e da coagulação.

A **aterogênese** envolve o transporte e a deposição de lipídios na camada subendotelial da parede da artéria (íntima). Isso ocorre no contexto de lesão endotelial e é acompanhado por uma reação inflamatória que afeta a íntima e envolve elementos da imunidade inata e da adaptativa (Cap. 38). Isso leva à remodelação da parede da artéria, incluindo a formação de novos vasos (angiogênese). A trombose (Cap. 7) é importante na maturação e desestabilização da placa (Fig. 18.7).

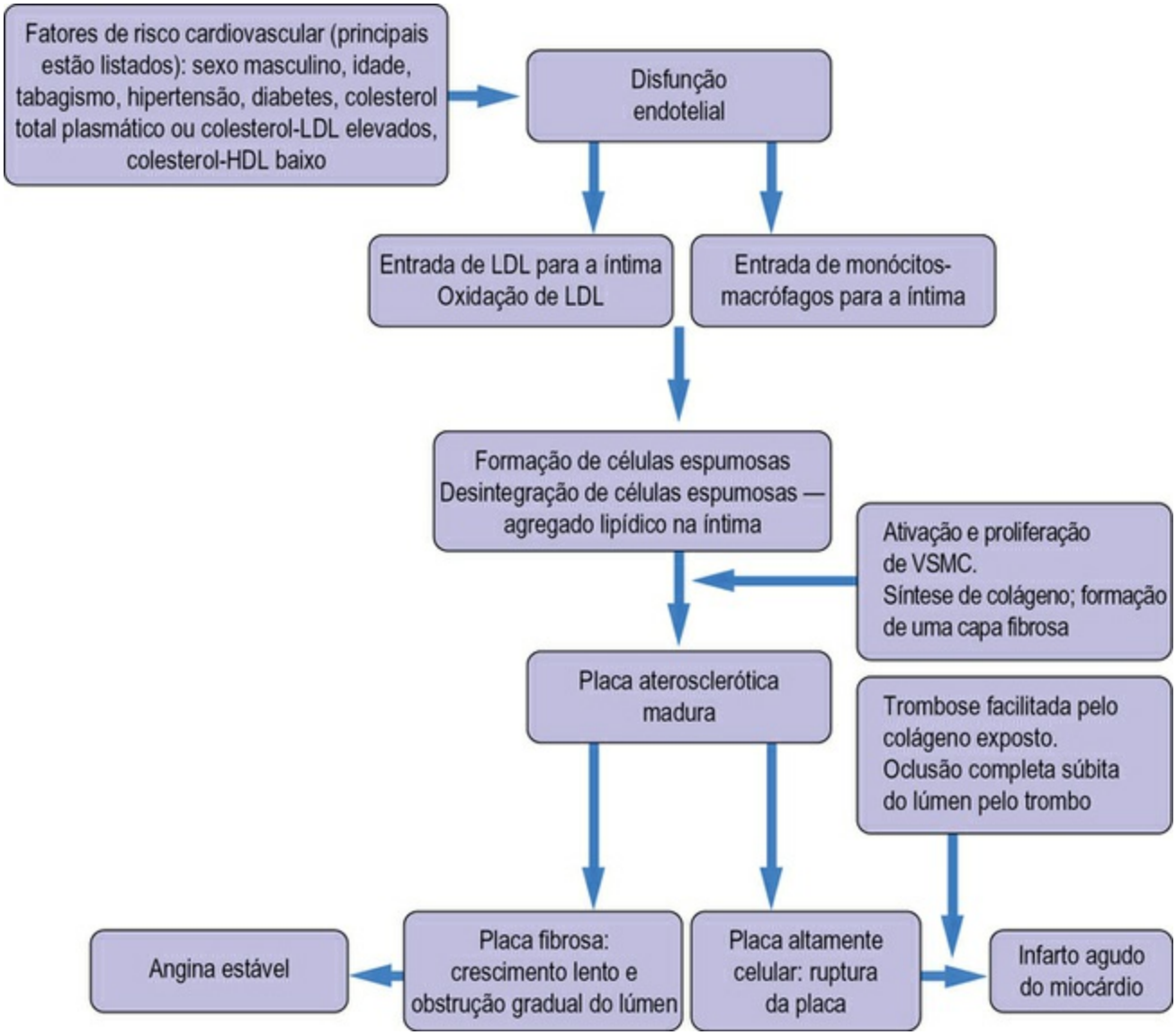


FIG. 18.7 O desenvolvimento da placa aterosclerótica. Os fatores de risco cardiovascular lesam o endotélio. Esta lesão leva à penetração de lipídios na íntima. A ativação de macrófagos leva a uma resposta de citocinas e à ativação e proliferação de células musculares lisas. O agregado lipídico que resulta da desintegração de macrófagos preenchidos com lipídios (células espumosas) fica coberto por uma capa fibrosa, formando a placa madura. Enquanto placas fibrosas estáveis causam uma angina de progressão lenta, a ruptura de uma placa instável, altamente celular, leva a eventos clínicos agudos como o infarto do miocárdio. VSMC, células musculares lisas vasculares.

O papel do endotélio vascular

O endotélio normal tem propriedades anticoagulantes e antiadesivas

O lúmen de uma artéria saudável é revestido por uma camada aderente de células endoteliais. A superfície endotelial normal é fortemente antitrombótica e antiadesiva: repele células em circulação no plasma. A parede arterial por si só consiste em três camadas: a camada subendotelial (a íntima), a camada média (a média, que contém células musculares lisas vasculares, VSMC), e a camada externa (a adventícia, composta por tecido conjuntivo laxo e contendo nervos relevantes). As substâncias podem penetrar no endotélio através das junções entre as células endoteliais ou passando através das próprias células. Partículas com diâmetro maior de aproximadamente 60-80 nm podem se

depositar na parede vascular.

O endotélio controla a vasodilatação através da secreção de óxido nítrico conhecido como fator relaxante derivado do endotélio (EDRF)

O endotélio controla a capacidade dos vasos sanguíneos de dilatar (vasodilatação) e de contrair (vasoconstrição) e, assim, de regular o fluxo sanguíneo em tecidos e órgãos. O óxido nítrico é a substância vasodilatadora mais importante. É sintetizado a partir da L-arginina pela NO sintase endotelial (eNOS). A atividade da eNOS é controlada pela concentração intracelular de cálcio. A eNOS é constitutivamente (constantemente) expressa no endotélio, enquanto outra isoenzima, a NOS indutível (iNOS), é encontrada em VSMC e em macrófagos. O óxido nítrico sinaliza através da guanilato ciclase e do GMP cíclico (Caps. 37 e 40). A diminuição da produção de óxido nítrico contribui para a hipertensão arterial. O fármaco **gliceril trinitrato**, normalmente usado para o alívio da dor torácica causada por fornecimento inadequado de oxigénio ao músculo cardíaco (causando a dor torácica característica conhecida como **angina *pectoris***), dilata as artérias coronárias através da estimulação da libertação de óxido nítrico.

A disfunção endotelial, a deposição lipídica e a reação inflamatória na parede vascular são os processos-chave na aterogênese

Crucialmente, existe conversa cruzada entre células endoteliais, VSMC, células inflamatórias derivadas do plasma (monócitos, macrófagos e linfócitos) e plaquetas sanguíneas. Todas elas secretam uma variedade de quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento (Cap. 42). Isso atrai células para as lesões ateroscleróticas, induz migração celular, proliferação, apoptose e produção de matriz extracelular com colágeno (Cap. 27, Fig. 27.9).

A disfunção endotelial precede a formação de lesões ateroscleróticas

A aterogênese se inicia por lesão endotelial (Figs. 18.8 e 18.9). Inicialmente, a lesão é mais funcional do que estrutural. O endotélio muda de um fenótipo antiaterogênico para um inflamatório pró-aterogênico ao perder sua qualidade de repelir células e ao admitir células inflamatórias na parede vascular. Também se torna mais permeável a lipoproteínas, que subsequentemente se depositam na íntima. Mais tarde, ocorre lesão estrutural ou uma destruição completa das células endoteliais.

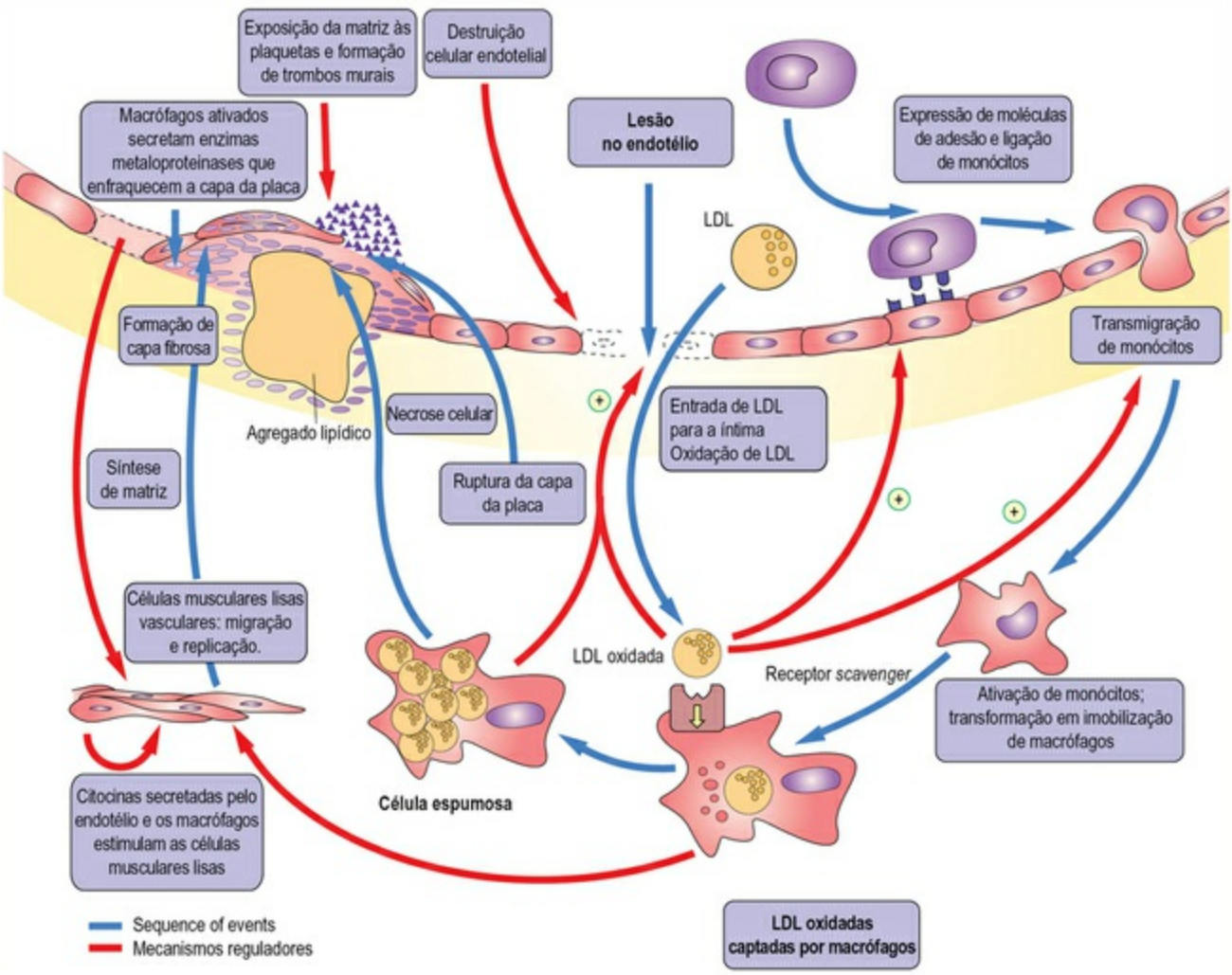


FIG. 18.8 Aterogênese: o processo. A aterogênese envolve disfunção endotelial, deposição de lipídios na íntima arterial, reação inflamatória de baixo grau, migração e proliferação de células musculares lisas vasculares e trombose. Observe o papel dos lipídios oxidados na formação de células preenchidas por lipídios e subsequentemente do agregado lipídico que se torna o centro da placa aterosclerótica. A sequência de eventos é descrita no texto.

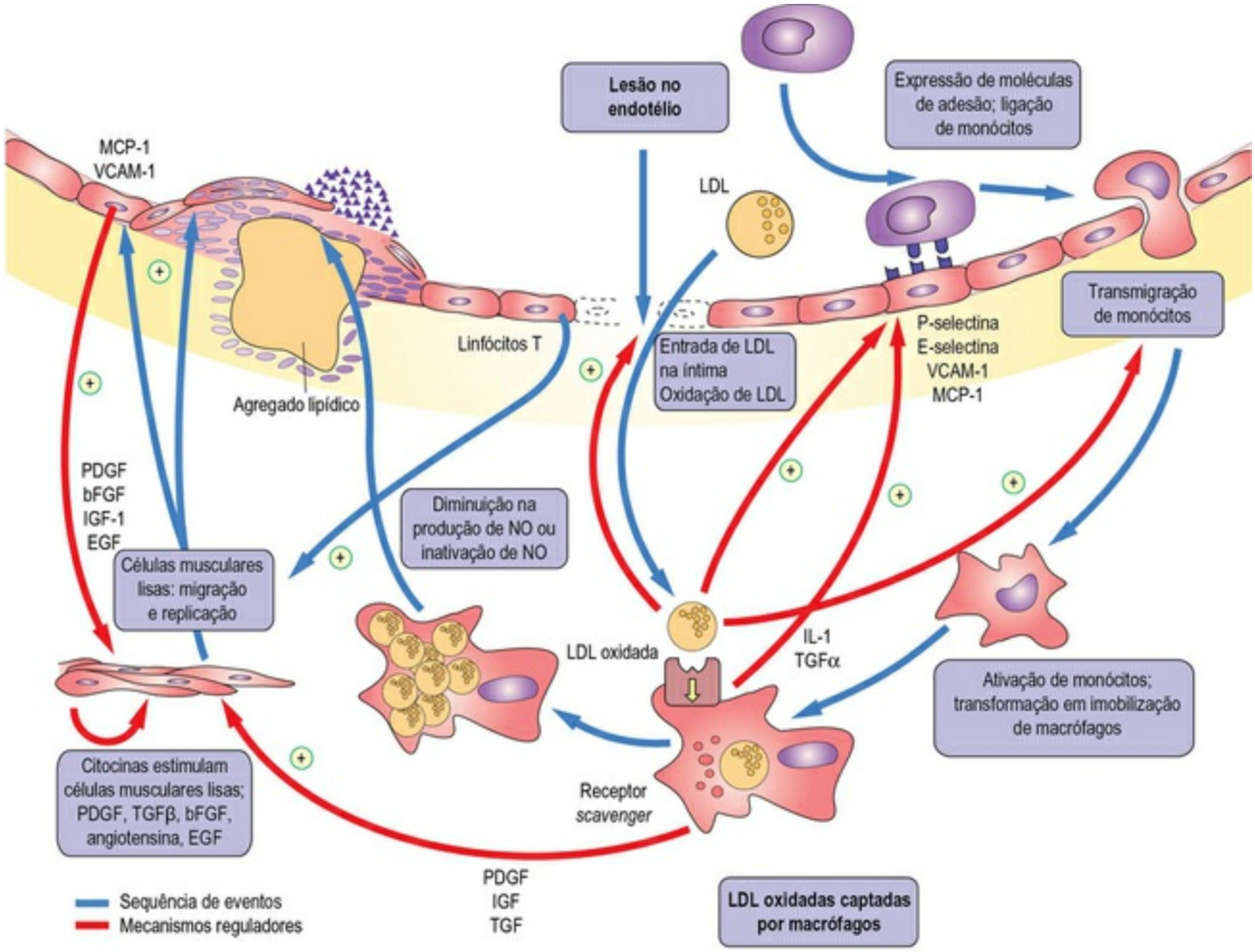


FIG. 18.9 Aterogênese: o papel dos fatores de crescimento e das citocinas. A aterogênese é guiada por sinais mediados por citocinas e fatores de crescimento gerados por células endoteliais, macrófagos, linfócitos T e células musculares lisas vasculares (VSMC). Existem múltiplas vias de ativação: por exemplo, a expressão de MCP-1 e de VCAM-1 pode ser estimulada por sinais gerados por macrófagos bem como por LDLs oxidadas. As VSMC podem ser estimuladas por células endoteliais disfuncionais, por macrófagos e por linfócitos T (observe também a ativação autócrina). Um hormônio, a angiotensina II, também participa deste processo. MCP-1, proteína quimioatraente de monócito 1; VCAM-1, molécula de adesão celular vascular 1; ICAM-1, molécula de adesão intracelular 1; TNFβ, fator de necrose tumoral β; TNFα, fator de necrose tumoral α; IFNγ, interferon-γ; NO, óxido nítrico; PGDF, fator de crescimento derivado de plaquetas; bFGF, fator de crescimento básico de fibroblastos; IGF-1, fator de crescimento tipo-insulina 1; EGF, fator de crescimento epidermal; TGFβ, fator de crescimento transformardor β; IL-1, interleucina 1.

A adesão celular ao endotélio é mediada por moléculas de adesão presentes em sua superfície. As selectinas (P-selectina e E-selectina) medeiam as interações iniciais com células circulantes. A molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1) promove a adesão de monócitos e linfócitos T. Em modelos animais experimentais a deficiência de VCAM-1 diminui a formação de placas ateroscleróticas. As células aderentes são subsequentemente estimuladas pela proteína quimioatraente de monócito 1 (MCP-1) a atravessar o endotélio e se depositar na íntima. Esse processo é ainda facilitado por uma protease (metaloproteinase de matriz 9, MMP-9), secretada pelos monócitos. A produção de óxido nítrico no endotélio lesado diminui promovendo a vasoconstrição. Como o óxido nítrico normalmente reduz a adesão de monócitos e a migração e proliferação de VSCM, estes processos se intensificam na sua ausência.

É de salientar que a expressão endotelial de moléculas de adesão é estimulada pela

maioria dos fatores de risco cardiovasculares, incluindo hipercolesterolemia, hipertensão, componentes da fumaça do cigarro, dieta rica em gorduras poli-insaturadas e também diabetes melito e obesidade. A ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, além de seus efeitos na pressão sanguínea, tem também efeitos pró-aterogênicos. A angiotensina II (Cap. 23) aumenta a expressão de VCAM-1 e de MCP-1. Estudos clínicos demonstram que os fármacos inibidores desse eixo (os inibidores da enzima conversora da angiotensina) são benéficos na prevenção cardiovascular.

Os monócitos migram para a íntima e se transformam em macrófagos residentes

Os monócitos também são atraídos para as placas em desenvolvimento pela citocina quimioatraente CCL2, que se liga aos receptores de monócitos. Na etapa seguinte, os monócitos se transformam em macrófagos, sob a influência do interferon-γ, do fator de necrose tumoral-α (TNFα), do fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos e do fator estimulador de colônia de monócitos 1 (MCSF-1), secretados por células endoteliais e por VSMC. Os macrófagos produzem também espécies reativas de oxigênio, que oxidam as LDL na íntima. Alguns macrófagos produzem citocinas como a interleucina 1β (IL-1β), IL-6 e TNFα. Outros expressam receptores *scavenger* (receptores de classe A e CD36) que se tornam ativos na endocitose das LDL oxidadas.

Quadro de conceitos avançados

A genética da aterosclerose

Os genes que codificam os receptores de LDL, as apolipoproteínas e o LRP6 são atualmente os únicos que foram diretamente ligados a doenças ateroscleróticas. Foram identificadas, por sequenciamento profundo (sequenciamento do genoma um grande número de vezes para diminuir a taxa de erro), duas variantes do **gene PCSK9** (em pacientes de descendência africana) responsáveis por níveis baixos de lipídios e por risco diminuído de infarto do miocárdio. Ao todo, aproximadamente 95 *loci* foram associados a lipídios LDL, HDL e triglicerídios — seu efeito combinado foi responsável por variações de aproximadamente 25% nas concentrações de LDL e HDL.

No entanto, a maioria das doenças cardiovasculares são **poligênicas.** A atual hipótese de trabalho (a hipótese da variante da doença comum) é que as variantes comuns, que ocorrem com uma frequência abaixo de 5%, desempenham um papel na fisiopatologia de doenças poligênicas. Os **estudos de associação de todo o genoma** (GWAS) testam associações entre a doença e variantes comuns ao longo de todo o genoma. Cerca de 30 *loci* estão presentemente associados a infarto do miocárdio e doença cardíaca coronária.

A capacidade técnica para realizar exames a todo o genoma mudou a forma como esse tipo de investigação é conduzida. Anteriormente, a acumulação de resultados de vários estudos individuais levava à elucidação dos mecanismos e depois talvez à pesquisa de seu papel na doença. Por outro lado, estudos de todo o genoma frequentemente fornecem evidência de associação entre a condição patológica e um

gene antes de se saber qualquer coisa acerca dos mecanismos subjacentes. Apenas posteriormente investigadores pesquisarão os processos que sustentam essa associação.

Os lipídios entram na camada subendotelial da parede da artéria (íntima)

As lipoproteínas menores, isto é, as remanescentes e as LDL, entram na parede vascular mais facilmente que as outras partículas e são, por isso, mais aterogênicas. Enquanto estão no plasma, as partículas de LDL estão protegidas da oxidação por antioxidantes como a vitamina C e o β-caroteno. No entanto, na íntima elas são depositadas em associação com proteoglicanos. Essa associação remove seu acesso a antioxidantes, e os ácidos graxos e os fosfolipídios nas LDL se tornam propensos à oxidação mediada por lipoxigenases, por mieloperoxidases e por oxidases NADPH expressas por macrófagos. As LDL oxidadas estimulam adicionalmente a expressão de VCAM-1 e MCP-1, mantendo a entrada de células na íntima; são também mitogênicas para os macrófagos. A apoB100, uma vez oxidada, liga-se aos receptores *scavenger* em vez de se ligar ao receptor apoB/E. Como os receptores *scavenger* não são regulados por retroalimentação pela concentração intracelular de colesterol, os macrófagos se sobrecarregam de lipídios oxidados e tomam a aparência de **células espumosas;** conglomerados dessas células são visíveis nas paredes arteriais e conhecidos como **estrias lipídicas.** As células espumosas em processo de morte libertam lipídios, que se juntam na íntima. Esses conglomerados tornam-se centros de placas ateroscleróticas maduras.

As células musculares lisas vasculares em migração alteram a estrutura da parede vascular

A secreção de fatores de crescimento por células endoteliais e macrófagos (o fator de crescimento derivado das plaquetas, PDGF, o fator de crescimento epidermal, EGF, e o fator de crescimento tipo insulina 1, IGF-1) ativa as VSMC presentes na média arterial. Sob a influência do PDGF e do TGFβ, as VSMC proliferam e migram para a íntima. A migração é ainda facilitada pela MMP-9. As células secretam moléculas de adesão bem como as citocinas inflamatórias IL-1 e TNFα. As VSMC ativadas também sintetizam matriz extracelular, particularmente colágeno, que se deposita na placa em crescimento. Todo esse processo rompe a estrutura da parede arterial: uma placa recém-formada pode se projetar no lúmen da artéria, obstruindo o fluxo sanguíneo.

A inflamação é fundamental para a aterogênese

A saída de monócitos e linfócitos T do plasma e sua ativação na íntima fazem parte da resposta inflamatória. Normalmente, essa resposta é iniciada por um antígeno ou trauma. Curiosamente, não foi identificado qualquer antígeno capaz de iniciar a aterogênese. Poderá existir um mimetismo molecular entre esse(s) antígeno(s) putativo(s) e os patógenos exógenos (Cap. 38). Os antígenos podem ser agentes infecciosos ou moléculas modificadas produzidas por espécies reativas de oxigênio. Por exemplo, o grupo fosforilcolina encontrado nas LDL oxidadas é também um componente

dos polissacarídios capsulares das bactérias. As LDL oxidadas permanecem como antígeno candidato, que poderia ser responsável pela estimulação da reação inflamatória na aterogênese.

A aterogênese envolve tanto a imunidade inata quanto a adaptativa. A imunidade inata inclui o reconhecimento de moléculas por receptores *scavenger* A e por glicoproteínas de membrana CD36. Quando moléculas que possuem padrões codificados na memória imune se ligam a esses receptores, ativam células através, por exemplo, da via que envolve o fator de transcrição NFκB. Em relação à imunidade adaptativa, células T predominantemente do subtipo CD4 estão presentes nas lesões ateroscleróticas e anticorpos circulantes do tipo IgM e IgG contra LDL modificadas foram identificados no plasma.

Os macrófagos (e células espumosas) presentes na placa continuam a secretar citocinas, fatores de crescimento, moléculas de adesão (IL-1β e TNFα, VCAM-1, IL8, IL-6) e MMPs. A IL-18 estimula a secreção de interferon-γ, que por sua vez estimula a proteína indutível por quimiocinas 10 e o quimioatraente-α de células T, que facilitam adicionalmente a entrada de células T. O interferon também facilita a ativação de células T-*helper* 1 para células efetoras que depois secretam o ligando CD40 (CD40L), uma citocina da família do TNF.

Por fim, ocorre a formação de novos vasos: os vasos recém--formados facilitam as hemorragias dentro da placa. A trombina aí gerada ativa monócitos, macrófagos, células endoteliais, VSMC e plaquetas que secretam mediadores inflamatórios como o CD40L (a ligação do CD40L ao receptor CD40 aumenta ainda mais a secreção de MMPs, citocinas e moléculas de adesão).

As adipocinas secretadas pelo tecido adiposo podem também contribuir para o ambiente aterogênico. A adiponectina (Cap. 22) é uma adipocina sensibilizadora da insulina. Tem ações anti-inflamatórias. Estimula a maturação de pré-adipócitos e diminui a massa de adipócitos. Seus efeitos no plasma incluem a diminuição da concentração plasmática de triglicerídios e o aumento do colesterol-HDL. Aumenta também a atividade da HTGL e da LPL. Além disso, diminui a expressão de VCAM-1, de receptores *scavenger* e de TNFα. Na obesidade, a concentração de adiponectina está diminuída desinibindo os processos pró--aterogênicos.

O papel das plaquetas

As plaquetas medeiam a adesão leucocitária e secretam CD40L. A adesão inicial das plaquetas ocorre através de receptores glicoproteicos plaquetários para o fator de von Willebrand e para o fibrinogênio. A adesão é ainda mediada por β_3-integrinas. As plaquetas aderentes contribuem para a inflamação ao secretar citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e moléculas de adesão. As plaquetas se ligam a células circulantes, e esses agregados aumentam a ativação leucocitária, adesão e migração celular.

O papel das prostaglandinas e dos leucotrienos

A síntese de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico é catalizada pela enzima

ciclo-oxigenase (COX). A COX-1 nas plaquetas é inibida pela Aspirina®; isso diminui a produção de tromboxano A_2 pró-trombótico e é responsável pelo efeito cardioprotetor do fármaco. As prostaglandinas pró-inflamatórias como a prostaglandina E_2 (PGE_2) contribuem para o processo inflamatório. Os leucotrienos (leucotrieno A_4 e B_4: lipídios derivados do ácido araquidônico) são gerados pela enzima 5-lipogoxigenase e contribuem para o recrutamento de linfócitos para as lesões ateroscleróticas.

A atividade inflamatória desestabiliza a placa, tornando-a propensa a ruptura

Na placa madura (Fig. 18.10) o agregado lipídico é rodeado por células espumosas, linfócitos e VSMC que migraram para a íntima. A "capa" da placa contém uma matriz de colágeno sintetizada pelas VSMC. A capa contém também macrófagos ativados e linfócitos T. As lesões avançadas podem calcificar.

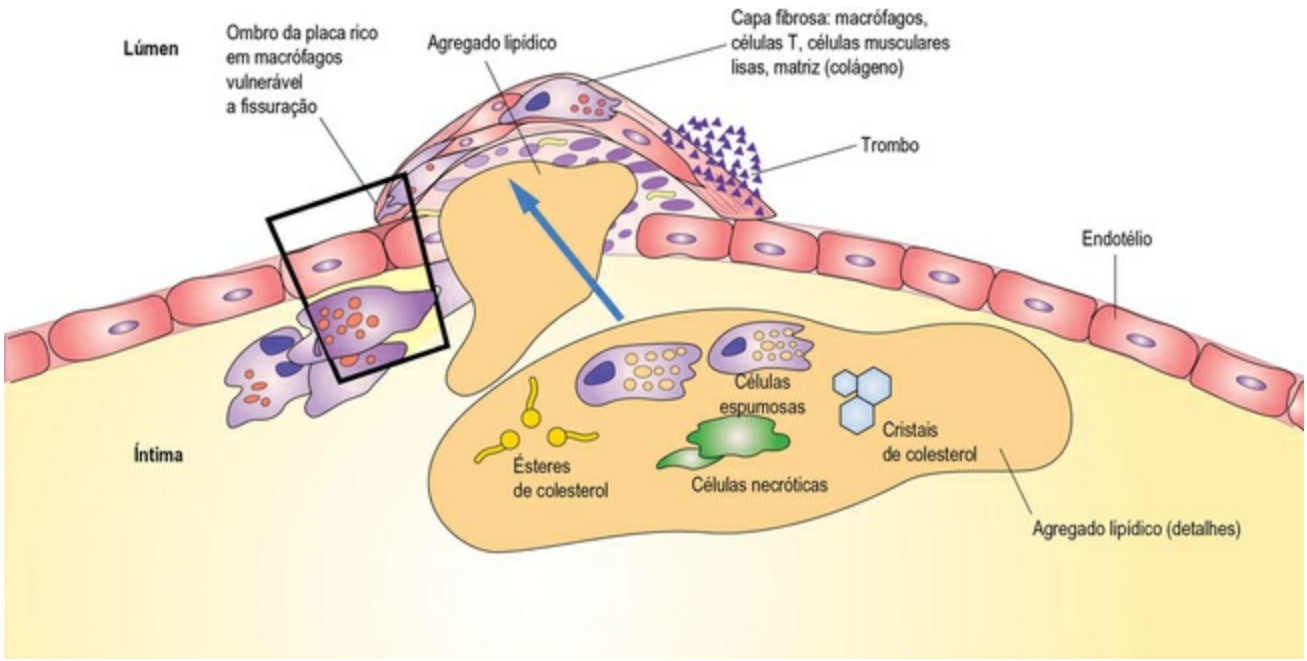


FIG. 18.10 A placa aterosclerótica. O centro lipídico e a capa fibrosa são as principais partes da placa aterosclerótica madura que emerge da parede vascular estruturalmente remodelada. A placa que é pobre em células e rica em colágeno é relativamente estável e cresce lentamente ao longo dos anos. Por outro lado, a placa que é rica em células e pobre em colágeno se torna instável e pode romper com facilidade. O processo-chave que leva à ruptura da placa é a digestão da matriz colagenosa da capa da placa por enzimas metaloproteinases (MMPs). A figura ilustra áreas vulneráveis a quebra e demonstra o trombo obstrutivo formado no local de ruptura.

O crescimento da placa é acelerado por ciclos de minirruptura da placa e trombose. Os macrófagos ativados e linfócitos T residem preferencialmente nas bordas da placa. A placa instável tem um conteúdo de VSMC diminuído e contém um número aumentado de macrófagos. Os macrófagos continuam a secretar MMPs (colagenases, gelatinases e estromielisina) que degradam a matriz. Além disso, proteases lisossomais (catepsinas) degradam colágeno e elastina. As células T ativadas secretam IFNγ e citocinas pró-inflamatórias que induzem os macrófagos a libertar MMPs e inibem a síntese de colágeno pelas VSMC, enfraquecendo ainda mais a capa da placa. As VSMC presentes nas regiões mais vulneráveis das bordas da placa podem sofrer apoptose.

A placa madura contém também elementos do sistema da coagulação. O fator tecidual, um receptor transmembranar de citocinas e o principal desencadeante fisiológico da cascata da coagulação (Cap. 7), é normalmente expresso nas VSMC e nos fibroblastos na adventícia. Na placa, pode ser expresso nas VSMC e nos macrófagos. A atividade da MMP-9 na placa estimula sua expressão. Além disso, o fator tecidual complexa-se com o fator de coagulação VII (FVII), o que induz sinalização celular através do receptor ativado por protease 2 (PAR2), estimulando uma variedade de eventos desde a quimiotaxia de monócitos, passando pela migração e proliferação de VSMC até a angiogênese e apoptose.

Finalmente, a trombina continua a ser produzida quer em placas recentes quer em placas avançadas e a formação de pequenos trombos no interior das placas contribui para sua instabilidade. Esses pequenos trombos aceleram o crescimento da placa. Por outro lado, após uma grande ruptura, a formação de um trombo na superfície da placa pode ocluir completamente o lúmen da artéria afetada. Tal oclusão corta o fornecimento de oxigênio e causa necrose dos tecidos, precipitando eventos clínicos súbitos — e por vezes catastróficos.

Avaliação do risco cardiovascular

Risco cardiovascular significa a probabilidade de um evento clínico ocorrer em um prazo de tempo definido

Risco cardiovascular é a probabilidade de uma pessoa sofrer (ou morrer de) um infarto ou acidente vascular encefálico em um período de tempo definido no futuro. Os principais fatores de risco cardiovascular estão listados na Tabela 18.5. Estudos epidemiológicos demonstram que o risco de doença cardiovascular está fortemente relacionado com as concentrações plasmáticas de colesterol total e de colesterol-LDL. Está também inversamente relacionado com a concentração de colesterol-HDL. Pesquisas recentes tornaram claro que a concentração plasmática de triglicerídios também contribui para o risco, ainda que em menor dimensão.

Tabela 18.5

Os fatores de risco cardiovascular principais e emergentes

Fator de risco	Comentário
Sexo masculino	O risco cardiovascular equaliza entre ambos os sexos em mulheres pós-menopáusicas
Idade	Em pessoas idosas, apenas a idade e o gênero podem determinar o alto risco
Tabagismo	
Hipertensão	
Colesterol total plasmático elevado (colesterol-LDL elevado)	
Colesterol-HDL plasmático baixo	
Diabetes melito	CVD é a principal causa de morte no diabetes
Função renal comprometida	
História familiar de CVD precoce	A história familiar de CVD precoce aumenta o risco calculado por um fator de 1,7-2,0
ApoB plasmática alta, apoA baixa	Novos estudos demonstram que a avaliação do risco baseada em apolipoproteínas é melhor que o baseado na concentração de colesterol
Lp(a) alto	Aperfeiçoa a avaliação do risco
hsCRP/fibrinogênio alto	Aperfeiçoa a avaliação do risco
Adiponectina baixa	Importante na obesidade e diabetes
Obesidade central	
Estilo de vida sedentário	
Aumento da espessura da íntima-média carotídeas	
Afastamento social	
Doenças inflamatórias autoimunes (artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, psoríase)	

Os fatores de risco realçados são os utilizados na maioria dos algoritmos de risco CVD.

De acordo com o Painel Nacional Americano de Educação e Tratamento de Colesterol em Adultos III (ATP III), o nível de colesterol total desejável é inferior a 5,2 mmol/L (200 mg/dL) e o nível ótimo de colesterol-LDL é inferior a 2,6 mmol/L (100 mg/dL). O risco aumenta exponencialmente quando a concentração total de colesterol é superior a 5,2 mmol/L (200 mg/dL). Parece não haver um valor mínimo de concentração de colesterol abaixo do qual o risco se mantivesse igual (por outras palavras, quanto mais baixo melhor).

As concentrações plasmáticas de lipídios são um componente essencial na avaliação do risco cardiovascular

Aceita-se agora que a concentração de colesterol que deve ser atingida com tratamento deve ser menor em pessoas com maior risco de eventos cardiovasculares, como

indivíduos com vários fatores de risco ou aqueles que já possuem doença relacionada com aterosclerose, diabetes ou doença renal. Nessas pessoas, o ATP III recomenda a diminuição do colesterol-LDL abaixo dos 2,6 mmol/L (100 mg/dL) e até abaixo dos 1,8 mmol/L (70 mg/dL).

As normas da Joint British Societies (JBS2), publicadas em 2005, recomendam que a concentração de colesterol total ótima em pessoas com risco cardiovascular aumentado seja de 4 mmol/L (155 mg/dL) e a concentração de colesterol-LDL ótima seja de 2,0 mmol/L (77 mg/dL). A concentração de triglicerídios não deve ser superior a 1,7 mmol/L.

Uma concentração baixa de colesterol-HDL significa risco aumentado. Uma concentração de colesterol-HDL inferior a 1 mmol/L (40 mg/dL) em homens ou a 1,2 mmol/L (47 mg/dL) em mulheres é considerada como baixa. Por outro lado, uma concentração acima de 1,6 mmol/L (60 mg/dL) parece fornecer alguma proteção contra doença coronária. Os princípios da análise dos lipídios na prática clínica estão sumarizados na Figura 18.11.

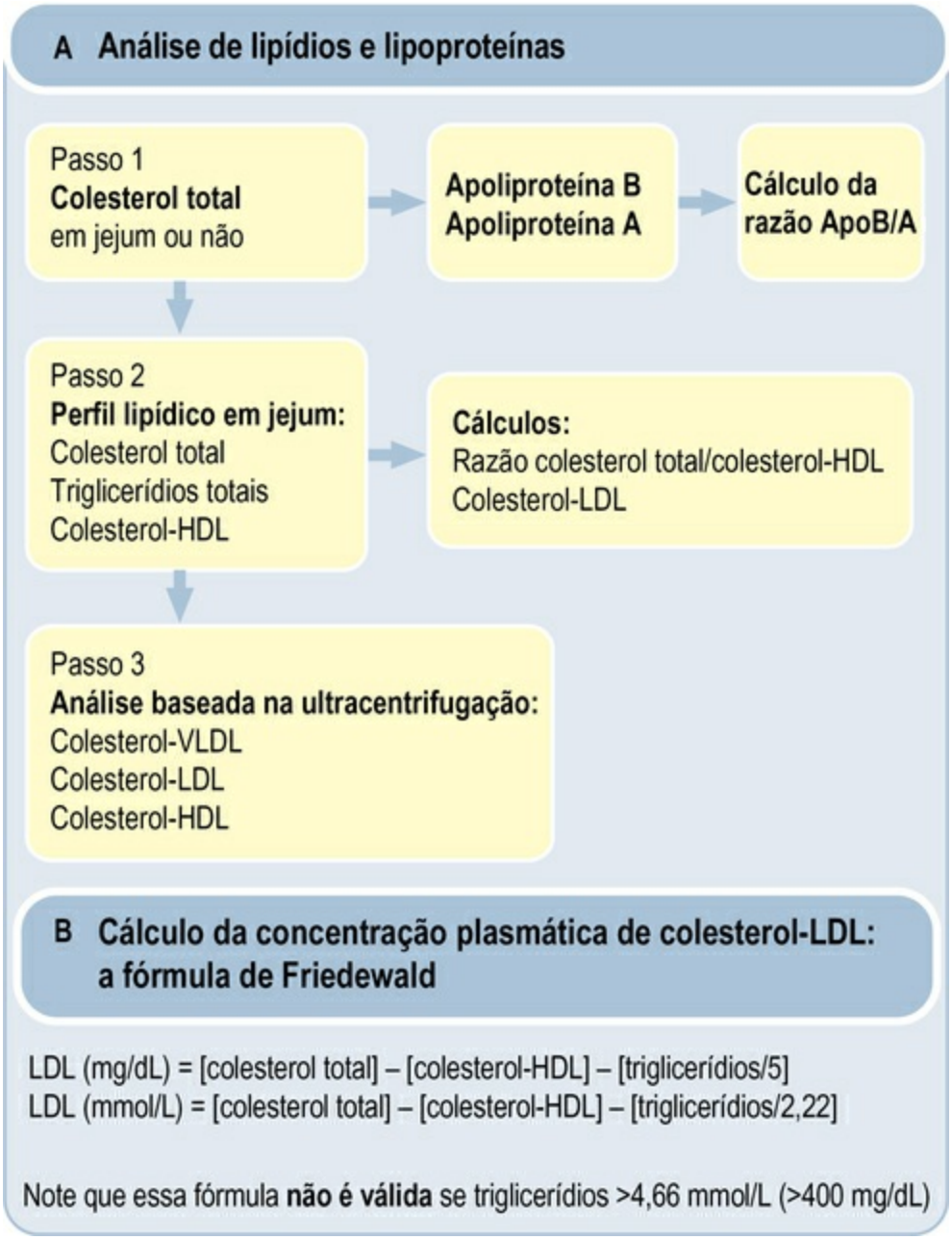


FIG. 18.11 Diagnóstico laboratorial de dislipidemias. **(A)** A medição dos lipídios e apolipoproteínas plasmáticas. Vários estudos demonstram que a medição da apoliproteína A e apolipoproteína B fornecem uma melhor avaliação do risco cardiovascular associado aos lipídios do que o colesterol total e o colesterol-HDL, respectivamente. **(B)** Cálculo da concentração plasmática de colesterol-LDL. Observe que os métodos laboratoriais habitualmente utilizados não medem a concentração de lipoproteínas como as LDL ou as HDL. Esses métodos apenas medem a fração de colesterol total que está presente nessas partículas: daí falarmos acerca do colesterol-LDL (LDL-C), do colesterol-HDL (HDL-C) ou do colesterol-VLDL (VLDL-C). Apo, apolipoproteína.

Deve ser lembrado que o risco associado às concentrações plasmáticas dos "principais" lipídios pode ser modificado por outros fatores, como o aumento da concentração plasmática de Lp(a), fibrinogênio ou proteína C-reativa (hsCRP, ver Quadro). De fato, cerca de 50% das pessoas que sofrem infarto do miocárdio têm concentrações "médias" de colesterol e de LDL. A busca por novos biomarcadores continua.

O risco CVD global é calculado usando calculadores de risco baseados na população

Existe um risco de um evento cardíaco associado a cada fator de risco. No entanto, o que

interessa mais ao clínico é o risco global. O cálculo desse risco é a base para medidas preventivas e tratamentos farmacológicos. Os algoritmos de risco foram desenvolvidos com base em dados de estudos epidemiológicos de longa duração. O algoritmo mais utilizado é derivado do estudo de Framingham nos Estados Unidos. É baseado na idade, na presença de diabetes, tabagismo, pressão arterial sistólica e nas concentrações de colesterol total e de colesterol-HDL. Relaciona-se com a população com idades entre 34 e 74 anos sem doença cardiovascular de base e envolve até 12 anos de seguimento. É importante notar que esse algoritmo não tem em conta a história familiar de doença cardiovascular precoce.



Quadro clínico

Mudanças no estilo de vida melhoram o perfil lipídico plasmático

Um homem de 57 anos foi encaminhado para a clínica de lipídios por hipertrigliceridemia. Seus triglicerídios eram de 6 mmol/L (545 mg/dL), o colesterol de 5 mmol/L (192 mg/dL) e o colesterol-HDL de 1 mmol/L (39 mg/dL). O paciente era obeso, consumia 30 unidades de álcool por semana e tinha um estilo de vida sedentário. Após dificuldades iniciais, o paciente conseguiu perder 7 kg em 6 meses, diminuiu o consumo de álcool para menos de 20 unidades por semana e iniciou a prática de exercício regularmente. Doze meses depois os seus triglicerídios eram de 2,5 mmol/L (227 mg/dL), o colesterol de 4,8 mmol/L (186 mg/dL) e o colesterol-HDL de 1,2 mmol/L (46 mg/dL).

Comentário

A mudança do estilo de vida pode resultar em melhorias apreciáveis no perfil lipídico. Para o atingir, os indivíduos necessitam comprometer-se a mudar o estilo de vida e a manter essa mudança durante um longo período de tempo.

Nota: 1 unidade de álcool é uma medida (60 mL) de uma bebida destilada, um copo (170 mL) de vinho, ou 300 mL de cerveja.

Na Europa, existe o score de *Assign*, a Avaliação Sistemática de Risco Coronário (SCORE) bem como o algoritmo do Estudo Cardiovascular Prospectivo de Munster (PROCAM). O algoritmo SCORE avalia o risco a 10 anos de um evento inicial fatal. A definição de alto risco é o risco a 10 anos de morte cardiovascular igual ou superior a 5%. Isso se traduz grosseiramente em um risco de qualquer evento cardiovascular (fatal ou não fatal: a base do algoritmo de Framingham) de cerca de 15%. O algoritmo SCORE também diferencia entre populações de alto e baixo risco na Europa. Outro algoritmo foi ainda desenvolvido pela Organização Mundial da Saúde (OMS).

Fármacos usados no tratamento de dislipidemias

O controle das dislipidemias combina modificações no estilo de vida e tratamento farmacológico

Uma prevenção cardiovascular eficaz necessita de uma abordagem que combine modificações no estilo de vida (cessação tabágica, dieta e exercício físico regular) com o tratamento farmacológico da dislipidemia, hipertensão e diabetes (Tabela 18.5). A concentração plasmática de LDL (e de colesterol total) pode diminuir cerca de 15% quando a pessoa segue de forma consistente uma dieta pobre em colesterol. Quando as medidas de estilo de vida não corrigem as alterações, deve-se recorrer ao tratamento farmacológico. Existem diversas classes de fármacos que reduzem a concentração plasmática de colesterol.



Quadro clínico

A presença de xantelasmas não indica necessariamente dislipidemia

Uma mulher de 28 anos desenvolveu marcas amarelas desagradáveis à vista à volta de ambos os olhos (xantelasmas). Estava assintomática e tinha uma boa tolerância ao exercício. Seu colesterol era de 5,0 mmol/L (192 mg/dL), os triglicerídios de 0,7 mmol/L (64 mg/dL) e o colesterol-HDL de 1,4 mmol/L (53 mg/dL). Não existia qualquer história familiar de doença coronária precoce.

Comentário

Os xantelasmas podem ocorrer em indivíduos com níveis de lipídios completamente normais. Por outro lado, depósitos lipídicos em tendões (xantomas tendinosos) são sempre diagnósticos de uma doença lipídica familiar. A paciente foi tranquilizada e encaminhada para cirurgia estética.



Quadro clínico

Definir risco cardiovascular

O conceito de risco cardiovascular é baseado na probabilidade de um evento cardiovascular ocorrer 10 anos a partir do ponto da avaliação. Diferentes cálculos de risco utilizam diferentes critérios: o Estudo de Framingham utiliza a probabilidade de qualquer doença cardiovascular (CVD), enquanto o sistema europeu SCORE foca na probabilidade de um evento fatal. Aqui se apresentam alguns exemplos dos critérios utilizados para avaliar o risco como baixo, moderado ou alto:

A classificação de risco SCORE desenvolvida pela Sociedade Europeia de Cardiologia/Sociedade Europeia de Aterosclerose (ESC/EAS) avalia o risco a 10 anos de CVD fatal:

risco muito alto é ≥10% probabilidade a 10 anos de CVD fatal;

risco alto é ≥5% mas <10%;

e risco moderado é ≥1% mas <5%.

Para converter o risco de CVD fatal para o risco total (fatal + não fatal) de CVD, é necessário multiplicar o risco SCORE calculado por 3 em homens e por 4 nas mulheres.

A estratificação de risco utilizada no Painel Nacional Americano de Educação e Tratamento de Colesterol em Adultos III (ATP III) é baseada na informação obtida no Estudo de Framingham e utiliza três níveis de risco a 10 anos de doença coronária fatal e não fatal: >20%, 10%-20% e <10%.

Observe que os limiares diagnósticos e os alvos de tratamento mudam e são periodicamente atualizados por organismos relevantes. Por exemplo, as normas ATP IV estão agora em desenvolvimento. Para obter as recomendações atuais consulte os *websites* das organizações listados no final do capítulo.



Quadro clínico

Concentrações de colesterol, triglicerídios e glicose: unidades convencionais e si

Estes são os valores aproximadamente equivalentes para o colesterol:

mmol/L	mg/dL
4	150
5	190
6	230
7	270
8	310

Os fatores de conversão a usar para a obtenção dos valores exatos são:
Colesterol: para converter mmol/L em mg/dL, multiplicar por 38,6;
Triglicerídios: para converter mmol/L em mg/dL, multiplicar por 88,5;
Glicose: para converter mmol/L em mg/dL, multiplicar por 18.

As estatinas inibem a HMG-CoA redutase

As estatinas, como a sinvastatina, a pravastatina, a atorvastatina e a rosuvastatina são inibidores competitivos da HMG-CoA redutase, a enzima limitante na síntese de colesterol. As estatinas reduzem primariamente o LDL plasmático. A inibição dessa enzima resulta na diminuição da concentração intracelular de colesterol. Essa diminuição, através dos fatores de transcrição SREBP (Cap. 17, Fig. 17.7), aumenta a expressão de receptores de LDL na membrana celular. Este aumento leva a uma captação aumentada de LDL e, consequentemente, a uma menor concentração plasmática de colesterol. O tratamento com estatinas reduz a concentração plasmática de colesterol em 30-60% e diminui o risco de eventos cardiovasculares futuros em 20-30%. As estatinas parecem também reduzir os fenômenos inflamatórios na parede arterial.

Os fibratos atuam através dos fatores de transcrição PPARα

Os derivados do ácido fíbrico (fibratos) são agonistas do fator de transcrição PPARα. Estimulam a atividade da LPL, reduzindo a concentração plasmática de triglicerídios e aumentando a concentração de colesterol HDL. Seu efeito nas LDL e no colesterol total é menos pronunciado que o das estatinas.

Os inibidores da absorção intestinal se ligam aos ácidos biliares e inibem o transportador de colesterol

Os inibidores da absorção intestinal de colesterol incluem fármacos mais antigos, as resinas de ligação a ácidos biliares, que raramente são usadas atualmente. Essas resinas reduzem a concentração plasmática de colesterol ao interromper a reciclagem de colesterol a partir do intestino e aumentando sua excreção. Um novo fármaco, o ezetimibe, inibe o transportador intestinal de colesterol, a proteína 1 do tipo Niemann_Pick C1 (NPC1L1), na borda em escova intestinal e reduz o colesterol total em aproximadamente 20%. Estão em curso estudos de longo prazo acerca de seus benefícios clínicos.

Os ácidos graxos omega-3 diminuem a concentração plasmática de triglicerídios

Uma redução significativa na concentração plasmática de triglicerídios pode ser atingida por tratamento com ácidos graxos omega-3 (óleo de peixe). Curiosamente, as preparações de óleo de peixe são também antiarrítmicas, particularmente em pacientes que já sofreram infarto do miocárdio.

O papel dos antioxidantes continua a ser estudado

Em animais, os antioxidantes, como o probucol ou a vitamina E, inibem o desenvolvimento de aterosclerose. Estudos epidemiológicos demonstraram que indivíduos que tomam antioxidantes como as vitaminas E e C ou o β-caroteno têm menor risco de doença cardiovascular. No entanto, estudos clínicos prospectivos do tratamento com antioxidantes não confirmaram esse benefício preventivo. Uma tentativa de explicação é que se trata de antioxidantes naturais (como os contidos nas frutas) ou suas combinações é que são protetoras, e não as substâncias puras.

Resumo

- As lipoproteínas transportam lipídios hidrofóbicos entre órgãos e tecidos.
- Os quilomícrons medeiam o transporte de gordura da dieta.
- As VLDL medeiam o transporte de gordura sintetizada endogenamente.
- Os quilomícrons, as VLDL e as lipoproteínas remanescentes são parte da rede de distribuição de energia do organismo: a via de transporte de combustível.
- As LDL são lipoproteínas ricas em colesterol que emergem da via de transporte de combustível. Quando presentes em excesso podem entrar na parede arterial.
- As HDL medeiam o transporte reverso de colesterol, como, por exemplo, a remoção de colesterol de células periféricas para o fígado.

- A aterogênese envolve disfunção endotelial, deposição de lipídios, reação inflamatória na parede arterial, ativação e proliferação de células musculares lisas arteriais e trombose. As principais doenças relacionadas com a aterosclerose são a doença coronária, o acidente vascular encefálico e a doença arterial periférica.
- As interações entre células participantes na aterogênense são mediadas por um conjunto de citocinas, fatores de crescimento e moléculas de adesão.
- A aterogênese destrói a estrutura da parede arterial e resulta na formação de uma placa aterosclerótica, que estreita o lúmen da artéria afetada. No entanto, a causa imediata de um ataque cardíaco não é o crescimento lento da placa, mas sua ruptura súbita.
- A avaliação do risco cardiovascular envolve medidas de vários parâmetros lipídicos e a identificação de outros fatores de risco como a hipertensão, o tabagismo ou a presença de diabetes. A intensidade do tratamento é orientada para o grau de risco calculado.

Questões para aprendizagem

1. Compare a composição das VLDL e das LDL.
2. Quais são as diferenças entre o transporte para os tecidos periféricos de triacilgliceróis da dieta e os triacilgliceróis sintetizados no fígado?
3. Descreva a via de transporte dos ácidos graxos da dieta.
4. Dê exemplos de interações entre diferentes tipos celulares na aterogênese.
5. Como é que a placa aterosclerótica rompe?
6. De que forma a disfunção endotelial contribui para a aterosclerose?

Leituras sugeridas

Borissoff, J. I., Spronk, H. M.H., ten Cate, H. The hemostatic system as a modulator of atherosclerosis. *N Engl J Med*. 2011; 364(18):1746–1760.

Dominiczak, M. H. Risk factors for coronary disease: the time for a paradigm shift? *Clin Chem Lab Med*. 2001; 39:907–919.

Dominiczak, M. H., Caslake, M. J. Apolipoproteins: metabolic role and clinical biochemistry applications. *Ann Clin Biochem*. 2011; 48:498–515.

Durrington, P. Dyslipidaemia. *Lancet*. 2003; 362:717–731.

Duval, C., Muller, M., Kersten, S. *PPAR alpha and dyslipidemia (review), Biochim Biophys Acta Mol Biol Cell Biol Lipids*. 2007; 1771:961–971.

Libby, P., Aikawa, M. Stabilization of atherosclerotic plaques: New mechanisms and clinical targets. *Nature Medicine*. 2002; 8:1257–1262.

Michalik, L., Auwerx, J., Berger, J. P., et al. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol Rev*. 2006; 58:726–741.

O'Donnell CJ, Nabel, EG: Genomics of cardiovascular disease. In : Genomic, medicine, Feero, W.G, Guttmacher, A.E, editors. N Engl J Med 365:2098-2109, 2011.

Packard, R. R.S., Libby, P. Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clin Chem*. 2008; 54:24–38.

Rader, D. J., Daugherty, A. Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. *Nature*. 2008; 451:904–913.

Sites

Familial hypercholesterolemia. Simon Broome Diagnostic criteria for index individuals and relatives. http://www.nice.org.uk/nicemedia/live/12048/41707/41707.pdf. (Accessed October 2012).

General Cardiovascular disease. Framingham Heart Study. www.framinghamheartstudy.org/risk/gencardio.html (Accessed May 2013).

The Task Force for the Management of Dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias. www.escardio.org/guidelines-surveys/esc-guidelines/guidelinesdocuments/guidelines-dyslipidemias-ft.pdf. (Accessed May 2013).

Marks, D., Thorogood, M., Neil, H. A., et al. A review on the diagnosis, natural history, and treatment of familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis*. 2003; 168:1–14. [(Accessed May 2013)].

Morris PB: ATP IV, CVD risk assessment and dyslipidemia. www.acli.com/Events/Documents/Tue22812%20-%20Lipidology%20-%20Pamela%20Morris.pdf (Accessed May 2013).

National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (ATP III) www.nhlbi.nih.gov/guidelines/cholesterol/index.htm. (Accessed May 2013).

National High Blood Pressure Education Program. Joint National Committee on the Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure (7th Report: known as JNC7) JNC8 is in development. www.nhlbi.nih.gov/guidelines/hypertension/ (Accessed May 2013).

National Institute for Health and Clinical Excellence (NICE), United Kingdom), http://publications.nice.org.uk/lipid-modification-cg67. (Accessed May 2013).

Von Eckardstein A: HDL in motion: molecular dynamics and disease pathophysiology. www.medscape.org/noscan/slideshow (Accessed May 2013).

CAPÍTULO 19

Biossíntese e Degradação de Aminoácidos

Allen B. Rawitch

Objetivos

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever os três mecanismos utilizados pelos seres humanos para a remoção do nitrogênio dos aminoácidos, anterior ao metabolismo dos seus esqueletos de carbono.
- Delinear a sequência das reações do ciclo da ureia e traçar o fluxo do nitrogênio dos aminoácidos dentro e fora do ciclo.
- Descrever a função da vitamina B_6 nas reações das aminotransferases.
- Definir os termos e dar exemplos de aminoácidos glicogênicos e cetogênicos.
- Resumir os fatores que contribuem para a absorção e a diminuição do *pool* de aminoácidos livres nos animais.
- Resumir as fontes e o uso da amônia nos animais e explicar o conceito de equilíbrio de nitrogênio.
- Identificar os aminoácidos essenciais e as fontes metabólicas dos aminoácidos não essenciais.
- Explicar as bases bioquímicas e os princípios da terapêutica para o tratamento da fenilcetonúria e da doença da urina em xarope de bordo.

Introdução

Os aminoácidos são uma fonte de energia da dieta e durante o jejum

Além da sua função como blocos estruturais formadores de peptídios e proteínas, e precursores de neurotransmissores e hormônios, os esqueletos de carbono de alguns aminoácidos podem ser utilizados para produzir glicose através da gliconeogênese, provendo assim um combustível metabólico para os tecidos que requerem ou preferem a glicose; esses aminoácidos são designados como aminoácidos glucogênicos ou

glicogênicos. Os esqueletos de carbono de alguns aminoácidos podem também produzir o equivalente de acetil-CoA ou acetoacetato, e eles são denominados de cetogênicos; indicando que podem ser metabolizados para formar precursores imediatos de lipídios ou corpos cetônicos. Em um indivíduo que consome quantidades adequadas de proteína, uma quantidade significativa de aminoácidos pode também ser convertida em carboidrato (glicogênio) ou gordura (triacilglicerol) para armazenamento. Ao contrário dos carboidratos e dos lipídios, os aminoácidos não possuem uma forma de armazenamento equivalente à do glicogênio ou da gordura.

Quando os aminoácidos são metabolizados, o excesso de nitrogênio resultante deve ser excretado. Uma vez que a forma primária na qual o nitrogênio é removido dos aminoácidos é a amônia, e, por ser a amônia livre muito tóxica, os seres humanos e a maioria dos animais superiores rapidamente convertem a amônia derivada do catabolismo do aminoácido em ureia, que é neutra, menos tóxica, muito solúvel e excretada na urina. Portanto, **o produto primário da excreção de nitrogênio nos seres humanos é a ureia, produzida pelo ciclo da ureia no fígado.** Os animais que excretam ureia são denominados ureotélicos. Em uma média entre os indivíduos, mais de 80% do nitrogênio excretado estão na forma de ureia (25-30 g/24 h). Quantidades menores de nitrogênio também são excretadas na forma de ácido úrico, creatinina e íon amônio.

Os esqueletos de carbono de muitos aminoácidos podem ser derivados dos metabólitos das vias centrais, permitindo a biossíntese de alguns aminoácidos em seres humanos. Os aminoácidos que podem ser sintetizados dessa maneira não são, portanto, requeridos na dieta (aminoácidos não essenciais), enquanto os aminoácidos que têm os esqueletos de carbono que não podem ser derivados do metabolismo normal dos seres humanos têm de ser fornecidos pela dieta (aminoácidos essenciais). Para a biossíntese de aminoácidos não essenciais, grupos amino têm de ser adicionados aos esqueletos de carbono apropriados. Isso geralmente ocorre através da transaminação de um α-cetoácido correspondente àquele aminoácido específico.

Metabolismo das proteínas da dieta e endógenas

Relação com o metabolismo central

A proteína muscular e os lipídios adiposos são consumidos para suportar a gliconeogênese durante o jejum e a inanição

Apesar de as proteínas corporais representarem uma proporção significativa de reservas potenciais de energia (Tabela 19.1), sob circunstâncias normais elas não são utilizadas para a produção de energia. No entanto, durante um jejum prolongado, a proteína muscular é degradada em aminoácidos para a síntese de proteínas essenciais e os cetoácidos para a gliconeogênese, a fim de manter a concentração de glicose no sangue, bem como fornecer carbonos para a produção de energia. Esses processos são responsáveis pela perda de massa muscular durante o jejum.

Tabela 19.1

Formas de armazenamento de energia no corpo

Combustível armazenado	Tecido	Quantidade (g)*	Energia (kJ)	(kcal)
Glicogênio	Fígado	70	1.176	280
Glicogênio	Músculo	120	2.016	480
Glicose livre	Fluidos corporais	20	336	80
Triacilglicerol	Adiposo	15.000	567.000	135.000
Proteína	Músculo	6.000	100.800	24.000

As proteínas representam uma reserva substancial de energia do corpo.

*Em um indivíduo com 70 kg.

(Adaptado com permissão de Cahill G. F. Jr, Clin Endocrinol Metab 1976;**5**:398.)

Além da sua função como uma importante fonte de esqueletos de carbono para o metabolismo oxidativo e a produção de energia, as proteínas da dieta têm de fornecer quantidades adequadas daqueles aminoácidos que nós não podemos sintetizar, para sustentar a síntese normal de proteínas. As relações da proteína corporal e da proteína da dieta com os *pools* centrais de aminoácidos e o metabolismo central estão ilustradas na Figura 19.1.

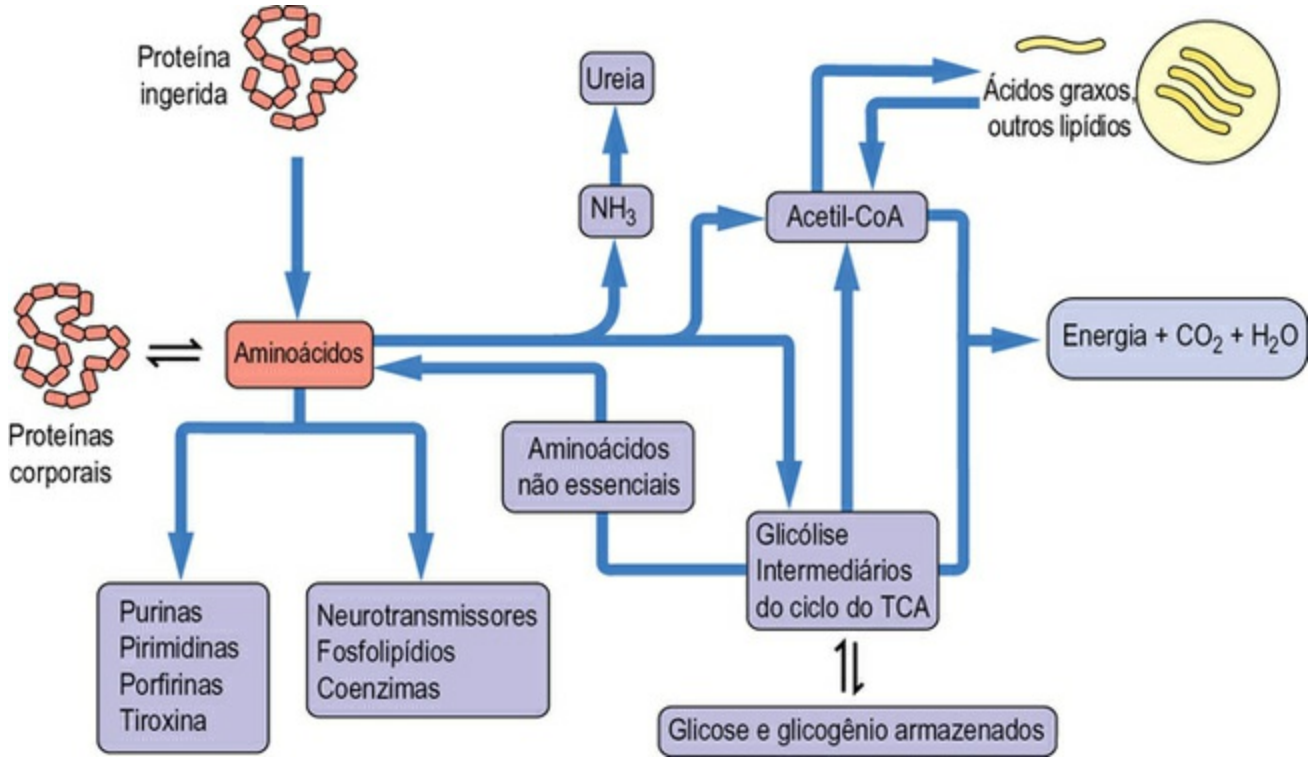


FIG. 19.1 Relações metabólicas entre os aminoácidos. O *pool* de aminoácidos livres é derivado da degradação e do *turnover* de proteínas corporais e da dieta. Os aminoácidos são precursores de importantes biomoléculas, incluindo hormônios, neurotransmissores e proteínas, e servem também como uma fonte de carbono para o metabolismo central, incluindo gliconeogênese, lipogênese e produção de energia.

Digestão e absorção das proteínas da dieta

A fim de a proteína da dieta contribuir tanto para o metabolismo energético quanto para o *pool* de aminoácidos essenciais, a proteína precisa ser digerida a aminoácidos livres ou pequenos peptídios e absorvida através do intestino. A digestão da proteína começa no estômago com a ação da pepsina, uma protease com um grupo carboxila que é ativa em um pH muito baixo encontrado no ambiente gástrico. A digestão continua à medida que o conteúdo estomacal é transferido para o intestino delgado e misturado com as secreções pancreáticas. Essas secreções pancreáticas são alcalinas e contêm os precursores inativos de várias serinoproteases, incluindo a tripsina, a quimotripsina e a elastase, além das carboxipeptidases. O processo é completado pelas enzimas no intestino delgado (Cap. 10). Depois que todos os di- ou tripeptídios remanescentes são degradados nos enterócitos, os aminoácidos livres são transportados para a veia porta e levados ao fígado para o metabolismo energético ou biossíntese, ou distribuídos para os outros tecidos a fim de satisfazerem necessidades semelhantes.

Turnover das proteínas endógenas

Além da ingestão, digestão e absorção dos aminoácidos provenientes da proteína da dieta, todas as proteínas no corpo têm uma meia-vida ou longevidade e são rotineiramente degradadas em aminoácidos e substituídas por proteínas recém-sintetizadas. Este processo de *turnover* da proteína é realizado no lisossomo ou pelos proteassomas. No caso da digestão lisossomal, o *turnover* da proteína começa com o englobamento da proteína ou organela em vesículas conhecidas como autofagossomos, por um processo conhecido como autofagia. As vesículas se fundem então com os lisossomos e as proteínas, os lipídios e as glicanas são degradados pelas hidrolases ácidas lisossomais. As proteínas citosólicas são degradadas primeiramente pelos proteassomas, que são complexos de alto peso molecular contendo múltiplas atividades proteolíticas. Existem duas vias, ubiquitina dependente (Cap. 34) e ubiquitina independente, para a degradação das proteínas citosólicas.



Quadro de conceitos avançados

A alanina e o fluxo de carbono e nitrogênio entre órgãos

Grande parte do fluxo de carbono que acontece entre os tecidos periféricos, como o músculo esquelético, e o fígado é facilitado pela liberação de alanina no sangue pelos tecidos periféricos. A alanina é convertida em piruvato no fígado, e o componente nitrogênio é incorporado à ureia. O piruvato pode ser utilizado na gliconeogênese para produzir glicose, que é liberada no sangue para retornar aos tecidos periféricos. Esse **ciclo glicose-alanina** permite a conversão líquida dos carbonos do aminoácido à glicose, a eliminação do nitrogênio do aminoácido como ureia e o retorno dos carbonos para os tecidos periféricos na forma de glicose.

O ciclo glicose-alanina funciona de uma maneira similar ao ciclo de Cori (Cap. 21) no

qual o lactato, liberado pelo músculo esquelético, é utilizado na gliconeogênese hepática, e a diferença-chave é que a alanina também transporta um átomo de nitrogênio para o fígado. A alanina e a glutamina são liberadas pelo músculo esquelético em quantidades aproximadamente iguais e representam quase 50% dos aminoácidos liberados pelo músculo esquelético no sangue — uma quantidade que, de longe, excede a proporção desses aminoácidos nas proteínas musculares. Assim, existe um remodelamento substancial dos aminoácidos derivados de proteínas pelas reações de transaminação, anterior à sua liberação pelo músculo.

Degradação de aminoácidos

Os aminoácidos destinados para o metabolismo energético têm de ser desaminados para produzirem o esqueleto de carbono

Existem três mecanismos para a remoção do grupo amino dos aminoácidos.

- **Transaminação** – a transferência do grupo amino para um cetoácido aceptor adequado (Fig. 19.2).

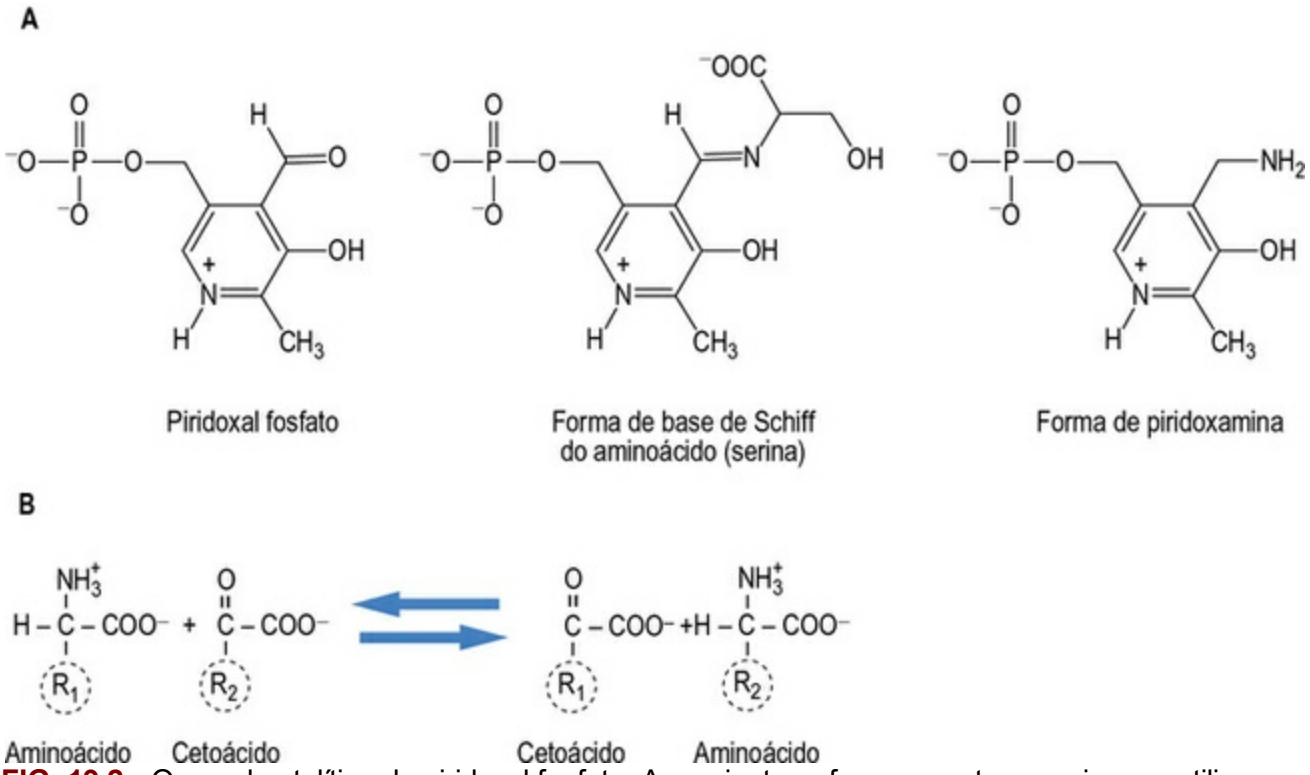


FIG. 19.2 O papel catalítico do piridoxal fosfato. As aminotransferases ou transaminases utilizam o piridoxal fosfato como um cofator. O aduto de piridoxamina atua como um intermediário na transferência do grupo amino entre um α-aminoácido e um α-cetoácido. **(A)** Estruturas dos componentes envolvidos. O cofator, piridoxal fosfato, é utilizado em uma variedade de reações catalisadas por enzimas envolvendo os componentes amino e ceto, incluindo as reações de transaminação e descarboxilação. **(B)** A transaminação envolve tanto um doador α-aminoácido (R_1) quanto um aceptor α-cetoácido (R_2). Os produtos são um α-cetoácido derivado do esqueleto de carbono de R_1 e um α-aminoácido do esqueleto de carbono R_2.

- **Desaminação oxidativa** – a remoção oxidativa do grupo amino, resultando em

cetoácidos e amônia (Fig. 19.3).

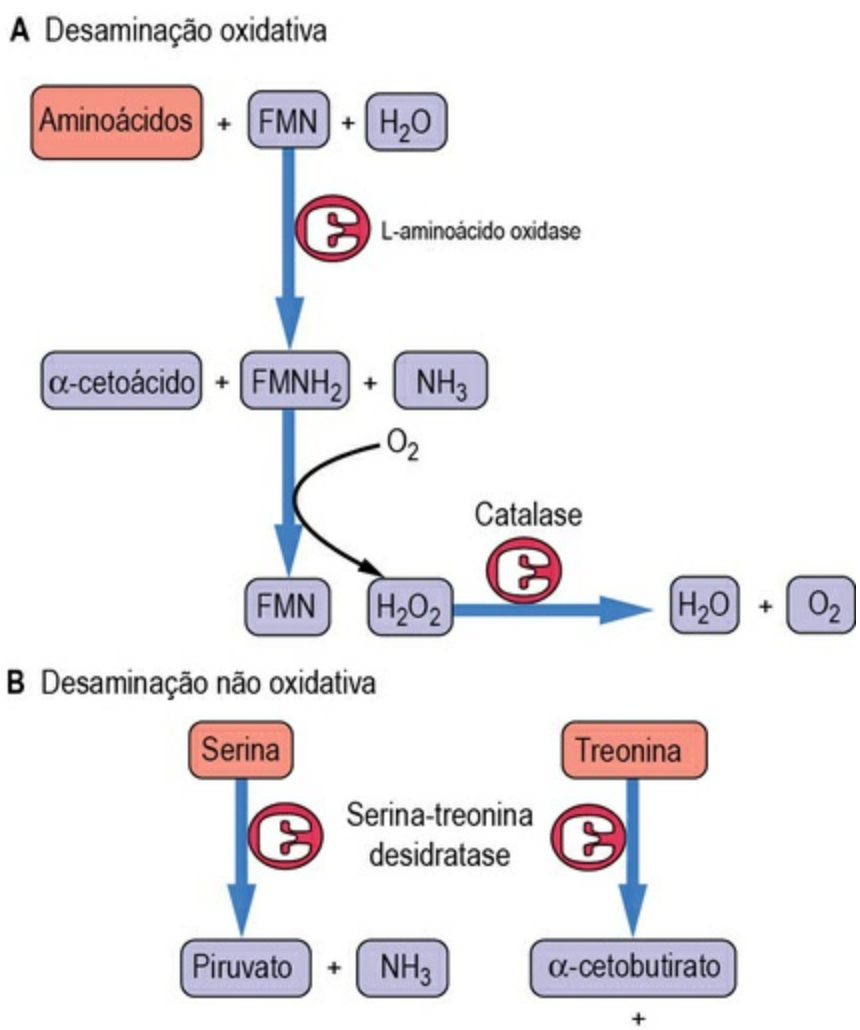


FIG. 19.3 Desaminação dos aminoácidos. A rota primária para a remoção do grupo amino se dá via transaminação, porém existem enzimas adicionais capazes de remover o grupo α-amino. **(A)** l-aminoácido oxidase produz amônia e um α-cetoácido diretamente, utilizando a flavina mononucleotídio (FMN) como cofator. A forma reduzida da flavina tem de ser regenerada utilizando o oxigênio molecular; essa reação é uma das várias que produzem H_2O_2. O peróxido é decomposto pela catalase. **(B)** Um segundo meio de desaminação é possível somente para os hidroxiaminoácidos (serina e treonina), através do mecanismo de uma desidratase; a base de Schiff, um intermediário imina, sofre hidrólise para formar um cetoácido e amônia.

- **Remoção de uma molécula de água pela desidratase** – por exemplo, serina ou treonina desidratase; essa reação produz um intermediário imina instável, que se hidrolisa espontaneamente para produzir um α-cetoácido e amônia (Fig. 19.3).

O mecanismo principal para a remoção dos grupos amino dos aminoácidos comuns se dá via transaminação, isto é, pela transferência do grupo amino do aminoácido para um α-cetoácido aceptor adequado, mais comumente para o α-cetoglutarato ou o oxalacetato, formando glutamato e aspartato, respectivamente. Várias enzimas, chamadas de **aminotransferases (ou transaminases),** são capazes de remover o grupo amino da maioria dos aminoácidos e produzir o α-cetoácido correspondente. As enzimas aminotransferases utilizam o piridoxal fosfato, um cofator derivado da **vitamina B_6**

(piridoxina), como um componente fundamental em seu mecanismo catalítico; a piridoxamina é um intermediário da reação. As estruturas das várias formas de vitamina B_6 e a reação resumida catalisada pelas aminotransferases são mostradas na Figura 19.2.

Os átomos de nitrogênio são incorporados à ureia a partir de duas fontes, glutamato e aspartato

A transferência de um grupo amino de um esqueleto de carbono de um cetoácido para outro pode parecer improdutiva e inútil por si só; no entanto, quando consideramos a natureza dos cetoácidos aceptores primários que participam nessas reações (α-cetoglutarato e oxalacetato) e seus produtos (glutamato e aspartato), a lógica desse metabolismo se torna clara. Os dois átomos de nitrogênio incorporados à ureia são derivados exclusivamente desses dois aminoácidos (Fig. 19.4), ligando assim o catabolismo do aminoácido ao metabolismo energético. A amônia, que é produzida primariamente a partir do glutamato, via reação da glutamato desidrogenase (GDH) (Fig. 19.5B), entra no ciclo da ureia como **carbamoil fosfato.** O segundo nitrogênio é fornecido à ureia pelo ácido aspártico. O fumarato é formado nesse processo e pode ser reciclado através do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) em oxalacetato, que pode aceitar outro grupo amino e entrar novamente no ciclo da ureia ou o fumarato pode ser utilizado no metabolismo energético ou na gliconeogênese. Desse modo, a canalização dos grupos amino, a partir de outros aminoácidos, em glutamato e aspartato fornece o nitrogênio para a síntese de ureia de uma forma apropriada para o ciclo da ureia (Fig. 19.4). As outras vias que levam à liberação dos grupos amino de alguns aminoácidos através da ação da aminoácido oxidase ou desidratases (Fig. 19.3) têm uma contribuição relativamente menor para o fluxo dos grupos amino dos aminoácidos para a ureia.

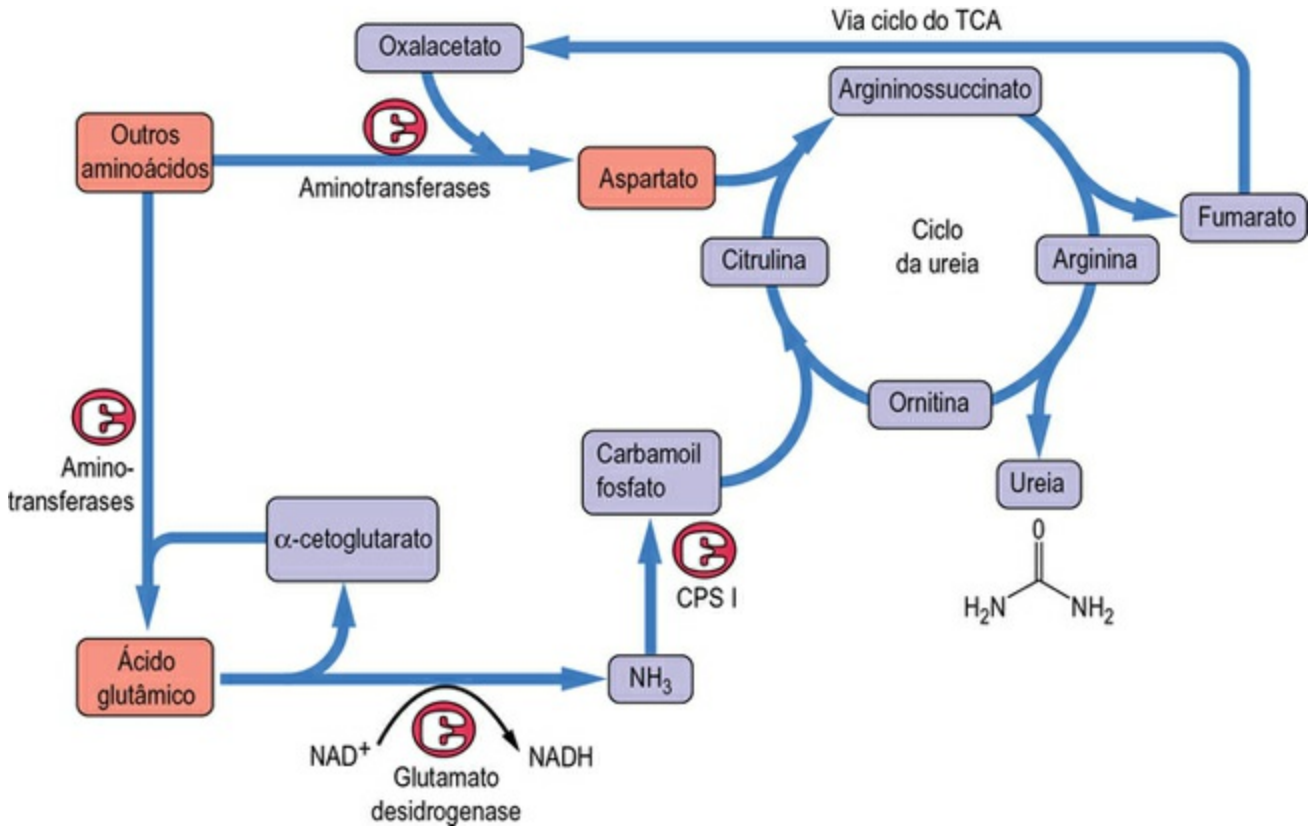


FIG. 19.4 Fontes de átomos de nitrogênio no ciclo da ureia. O nitrogênio entra no ciclo da ureia proveniente da maioria dos aminoácidos via transferência do grupo α-amino para o oxalacetato ou para o α-cetoglutarato, para formar o aspartato ou glutamato, respectivamente. O glutamato libera amônia no fígado através da ação da GDH (Fig. 19.5). A amônia é incorporada ao carbamoil fosfato e o aspartato se combina com a citrulina para fornecer o segundo nitrogênio para a síntese de ureia. O oxalacetato e o α-cetoglutarato podem ser reciclados repetidamente para canalizar o nitrogênio dentro dessa via. CPS-I, carbamoil fosfato sintetase-I.

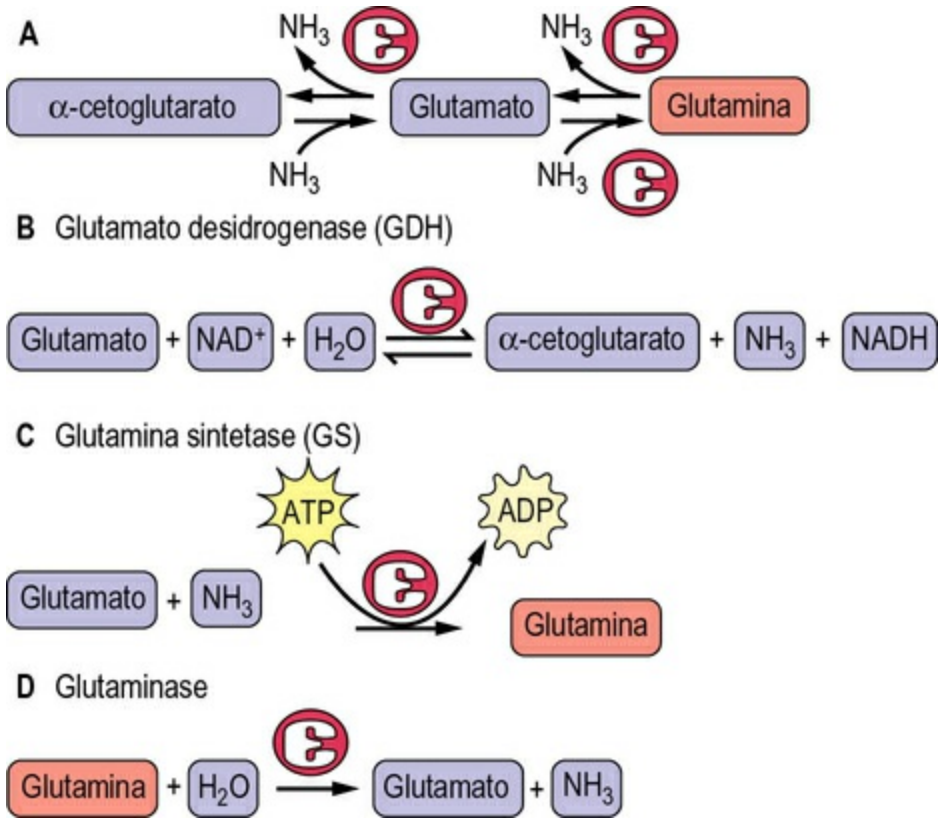


FIG. 19.5 Relações entre glutamato, glutamina e α-cetoglutarato.
As várias formas do esqueleto de carbono do ácido glutâmico têm funções-chave no metabolismo dos grupos amino. **(A)** Três formas do mesmo esqueleto de carbono. **(B)** A reação da glutamina desidrogenase é uma reação reversível que pode produzir glutamato a partir do α-cetoglutarato ou converter glutamato em α-cetoglutarato e amônia. Essa última reação é importante na síntese da ureia porque os grupos amino são transferidos ao α-cetoglutarato via transaminação a partir de outros aminoácidos. **(C)** A glutamina sintetase catalisa uma reação, que requer energia, com uma função importante no transporte dos grupos amino de um tecido para outro; ele também fornece um tampão contra as altas concentrações de amônia livre nos tecidos. **(D)** A segunda metade do sistema de transporte da glutamina para o nitrogênio utiliza a enzima glutaminase, que hidrolisa a glutamina em glutamato e amônia. Essa reação é importante no rim para o gerenciamento do transporte de prótons e o controle do pH.

Quadro de teste clínico

Medição do nitrogênio ureico no sangue

As medições da ureia sanguínea (também reportada pelos laboratórios como BUN ou nitrogênio ureico no sangue) são críticas no monitoramento de pacientes com uma variedade de doenças metabólicas, nas quais o metabolismo dos aminoácidos pode estar afetado e no rastreamento das condições de indivíduos com problemas renais. A metodologia tradicional utilizada para medir a ureia no sangue se baseia na ação da enzima urease, que converte a ureia em CO_2 e amônia. A amônia resultante pode ser detectada espectrofotometricamente pela formação de um composto colorido após a reação com fenol ou um composto relacionado (reação de Berthelot).

Quadro clínico

Reação ao glutamato monossódico

Uma mulher saudável de 30 anos apresentou um início súbito de dor de cabeça, sudorese e náuseas após comer em um restaurante oriental. Ela se sentiu fraca e apresentou formigamento e uma sensação de calor em sua face e na parte superior do tronco. Os sintomas passaram em cerca de 30 minutos, e ela não apresentou problemas posteriores. Após consultar seu médico no dia seguinte, ela aprendeu que alguns indivíduos reagem a comidas contendo altos níveis do aditivo alimentar glutamato monossódico, o sal de sódio do ácido glutâmico. O glutamato monossódico é um aditivo alimentar comum usado para acentuar o sabor em muitos alimentos. É uma das principais substâncias responsáveis pela sensação umami ou saborosa que acentua os efeitos desse sabor em relação a outras sensações básicas de sabor e combinação de sabores.

Comentário

Os sintomas semelhantes aos da gripe que desenvolveu, previamente descritos como "síndrome do restaurante chinês", foram atribuídos aos efeitos sobre o sistema nervoso central (SNC) do glutamato ou do seu derivado, o neurotransmissor inibitório, ácido g-aminobutírico (GABA). Interessantemente, estudos mostraram que esse fenômeno não causa um dano permanente ao SNC e que, apesar de o broncoespasmo poder ser desencadeado em indivíduos com asma grave, os sintomas são geralmente breves e completamente reversíveis. O glutamato monossódico continua a ser um aditivo amplamente utilizado em muitos alimentos processados e é aprovado pela FDA.

A função central da glutamina

A amônia é desintoxicada por incorporação na glutamina, e depois eventualmente na ureia

Além da função do glutamato como um transportador dos grupos amino através da GDH, o glutamato serve como precursor da glutamina, um processo que consome uma molécula de amônia. Isso é importante porque a glutamina, juntamente com a alanina, é o transportador-chave dos grupos amino entre os vários tecidos e o fígado e está presente em maiores concentrações do que a maioria dos outros aminoácidos no sangue. As três formas do mesmo esqueleto de carbono, α-cetoglutarato, glutamato e glutamina, são interconvertidas via aminotransferases, glutamina sintetase, glutaminase e GDH (Fig. 19.5). Dessa forma, a glutamina pode servir como um tampão para a utilização da amônia, como uma fonte de amônia, e como um transportador dos grupos amino. Devido à amônia ser muito tóxica, um equilíbrio tem de ser mantido entre a sua produção e utilização. Um resumo das fontes e vias que utilizam ou produzem amônia é mostrado

na Figura 19.6. Deve-se notar que a reação da GDH é reversível sob condições fisiológicas caso os grupos amino sejam requeridos para os aminoácidos e outros processos biossintéticos.

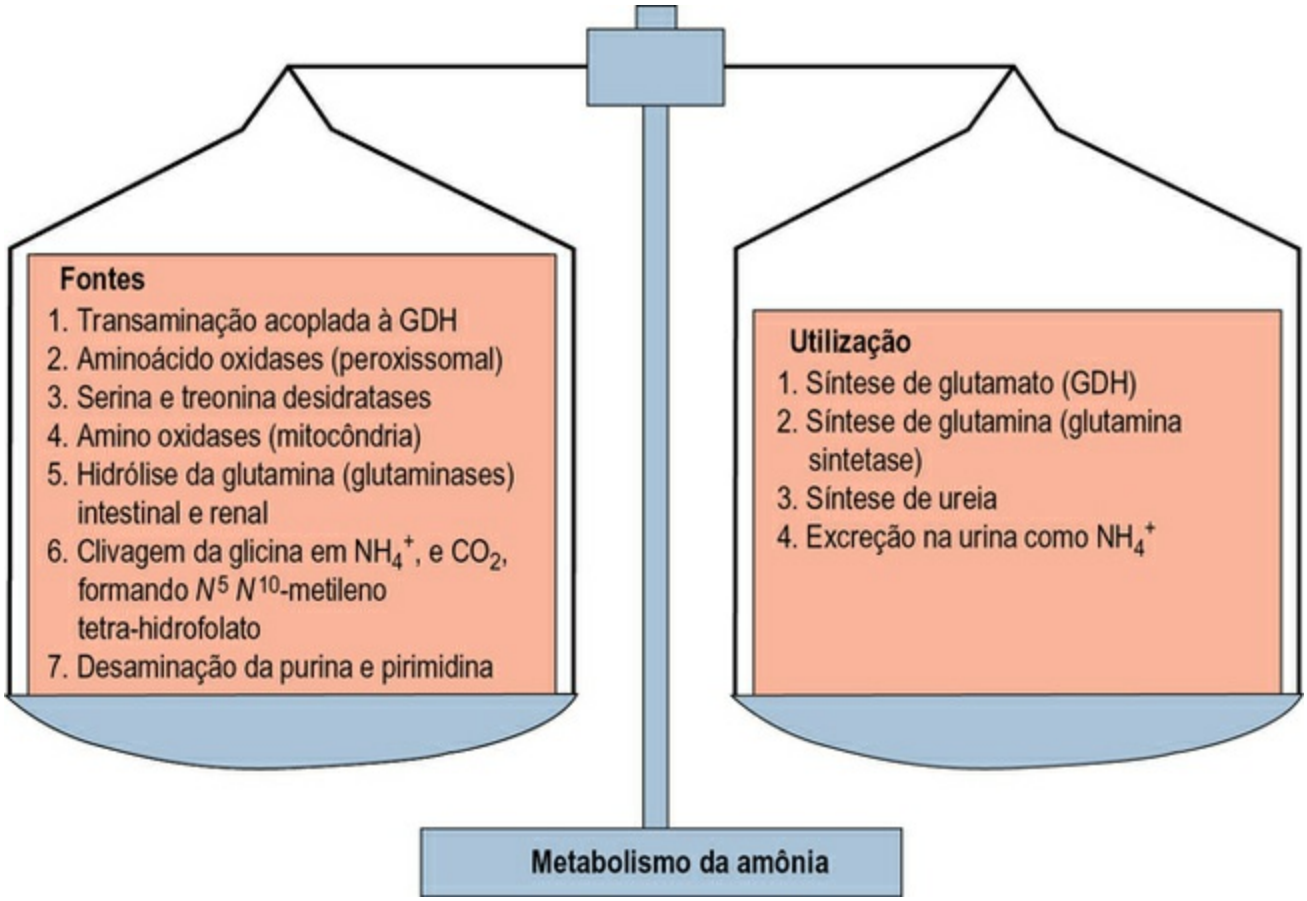


FIG. 19.6 Equilíbrio no metabolismo da amônia. O equilíbrio entre a produção e a utilização da amônia livre é crítico para a manutenção da saúde. Esta figura resume as fontes e as vias que utilizam amônia. Embora a maior parte dessas reações ocorra em muitos tecidos, a síntese da ureia e o ciclo da ureia são restritos ao fígado. A glutamina e a alanina funcionam como transportadores primários de nitrogênio dos tecidos periféricos para o fígado.

O ciclo da ureia e sua relação com o metabolismo central

O ciclo da ureia é uma via hepática para eliminação do excesso de nitrogênio

A ureia é o principal produto da excreção do nitrogênio nos seres humanos (Tabela 19.2). O ciclo da ureia (Fig. 19.4) foi o primeiro ciclo metabólico a ser bem definido; sua descrição precede a do ciclo do TCA. O início do ciclo da ureia pode ser considerado como a síntese de carbamoil fosfato a partir do íon amônio, derivado primariamente do glutamato via GDH (Fig. 19.5) e do bicarbonato na mitocôndria do fígado. Essa reação requer duas moléculas de ATP e é catalisada pela enzima **carbamoil fosfato sintetase I (CPS I)** (Fig. 19.7), que é encontrada em altas concentrações na matriz mitocondrial.

Tabela 19.2
Excreção urinária de nitrogênio

Metabólito urinário	g excretado/24 h*	% do total
Ureia	30	86
Íon amônio	0,7	2,8
Creatinina	1,0-1,8	4-5
Ácido úrico	0,5-1,0	2-3

*Valores aproximados em média de um homem adulto.

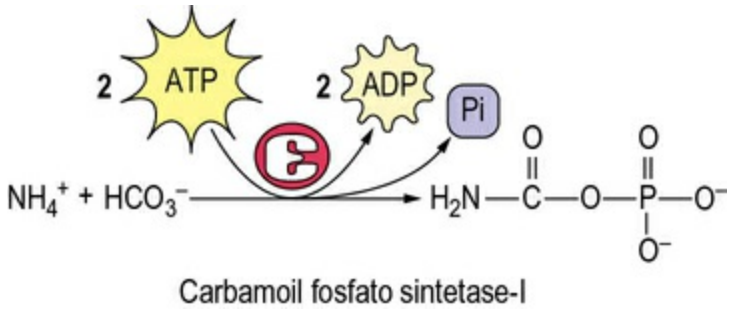


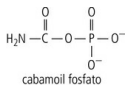
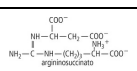
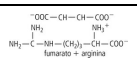
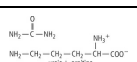
FIG. 19.7 Síntese de carbamoil fosfato. O primeiro nitrogênio, derivado da amônia, entra no ciclo da ureia como carbamoil fosfato, sintetizado pela carbamoil fosfato sintetase I, no fígado.

A isoenzima mitocondrial, CPS I, é incomum, no sentido de que ela requer a *N*-acetilglutamato como cofator. Esta enzima é uma das duas enzimas carbamoil fosfato sintetase, que tem função-chave no metabolismo. A segunda, CPS II, é encontrada no citosol, não requer a *N*-acetilglutamato e está envolvida na biossíntese de pirimidina (Cap. 31).

A **ornitina transcarbamoilase** catalisa a condensação de carbamoil fosfato com o aminoácido **ornitina,** para formar a **citrulina:** Figura 19.4 para a via e Tabela 19.3 para as estruturas. Por sua vez, a citrulina é condensada com o aspartato para formar argininossuccinato. Essa etapa é catalisada pela argininossuccinato sintetase e requer ATP; a reação cliva o ATP em adenosina monofosfato (AMP) e pirofosfato inorgânico (PPi) (dois equivalentes de ATP). A formação de argininossuccinato incorpora o segundo átomo de nitrogênio destinado à ureia. O argininossuccinato é clivado pela argininosuccinase em arginina e fumarato, e a arginina é, então, clivada pela **arginase** para a produção de ureia e ornitina. A ornitina e o fumarato podem entrar novamente no ciclo da ureia, enquanto a ureia se difunde no sangue, é transportada para o rim e é excretada na urina. O processo líquido da ureogênese está resumido na Tabela 19.4.

Tabela 19.3

Enzimas do ciclo da ureia

Enzima	Reação catalisada	Observações	Produto da reação
Carbamoil fosfato sintetase	Formação de carbamoilfosfato a partir de amônia e CO_2	Fixa a amônia liberada pelos aminoácidos, utiliza 2 ATPs, localizada na mitocôndria, a deficiência leva a altas concentrações de amônia no sangue e toxicidade relacionada	 cabamoil fosfato
Ornitinatranscarbamoilase	Formação de citrulina a partir de ornitina e carbamoil fosfato	Libera P_i, um exemplo de transferase, localizada na mitocôndria, a deficiência leva a altas concentrações de amônia e ácido orótico no sangue, enquanto o carbamoil fosfato é desviado para a biossíntese de pirimidina	 citrulina
Argininossuccinato sintetase	Formação de argininos succinato a partir de citrulina e aspartato	Requer ATP, que é clivado em AMP + PP_i — um exemplo de ligase, localizada no citosol, a deficiência leva a altas concentrações de amônia e citrulina no sangue	 argininossuccinato
Arginino succinase	Clivagem da argininos succinato em arginina e fumarato	Um exemplo de liase, localizada no citosol, a deficiência leva a altas concentrações de amônia e citrulina no sangue	 fumarato + arginina
Arginase	Clivagem de arginina em ornitina e ureia	Um exemplo de hidrolase, localizada no citosol, e principalmente no fígado, a deficiência leva a um aumento moderado de amônia no sangue e altas concentrações de arginina no sangue	 ureia + ornitina

Cinco enzimas catalisam o ciclo da ureia no fígado. A primeira enzima, CPS-I, que fixa NH_4^+ como carbamoil fosfato, é a enzima reguladora e é sensível ao efetor alostérico N-acetilglutamato.

Tabela 19.4

Síntese de ureia

Reações componentes da síntese de ureia		
$CO_2 + NH_3 + 2$ ATP	→	Carbamoil fosfato + 2 ADP + P_i
Carbamoil fosfato + ornitina	→	Citrulina + P_i
Citrulina + aspartato + ATP	→	Argininossuccinato + AMP + PP_i
Argininossuccinato	→	Arginina + fumarato
Arginina	→	Ureia + ornitina
$CO_2 + NH_3 + 3$ ATP + aspartato	→	Ureia + 2 ADP + AMP + 2 P_i + PP_i + fumarato

O ciclo da ureia está dividido entre a matriz mitocondrial e o citosol

As duas primeiras etapas do ciclo da ureia ocorrem na mitocôndria. A citrulina que é

formada na mitocôndria é movida, então, para o citosol por um sistema de transporte passivo específico. O ciclo é completado no citosol com a liberação da ureia a partir da arginina e a regeneração da ornitina. A ornitina é transportada de volta através da membrana mitocondrial para continuar o ciclo. Os carbonos do fumarato, liberados na etapa da argininosuccinase, podem também entrar novamente na mitocôndria e ser reciclados pelas enzimas do ciclo do TCA em oxalacetato e por último em aspartato (Fig. 19.8), completando assim a segunda parte do ciclo da ureia. A síntese da ureia ocorre quase que exclusivamente no fígado, e a função da enzima arginase, em outros tecidos é, provavelmente, relacionada mais intimamente com os requerimentos de ornitina para a síntese de poliamina do que com a produção de ureia.

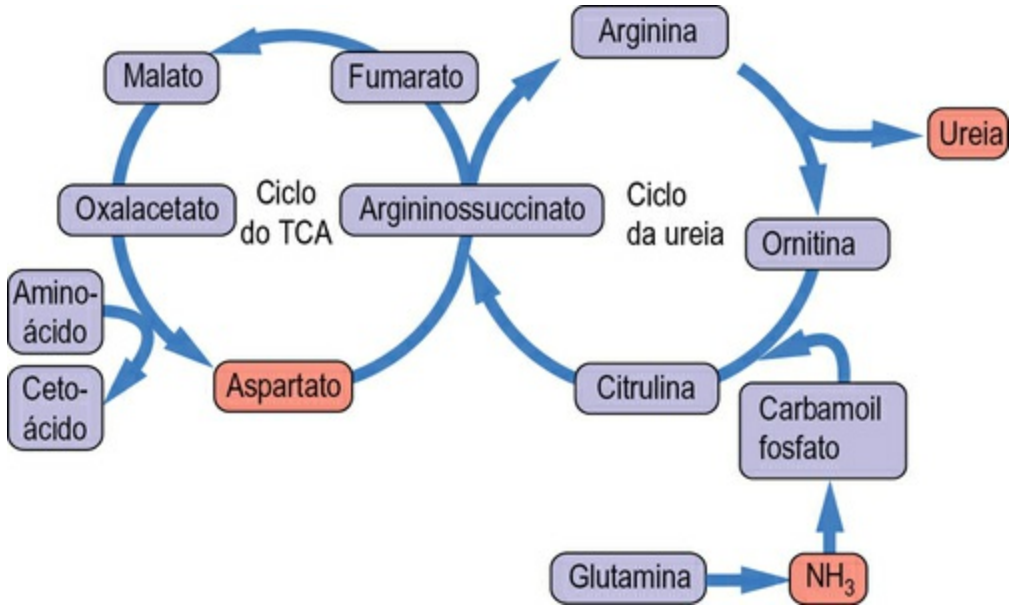


FIG. 19.8 Os ciclos do ácido tricarboxílico e da ureia. Análises do ciclo da ureia revelam que na realidade são dois ciclos, com o fluxo de carbono dividido entre o processo sintético primário de ureia e a reciclagem do fumarato em aspartato; o último ciclo ocorre na mitocôndria e envolve partes do ciclo do TCA.

Quadro de conceitos avançados

Síntese de carbamoil fosfato

A enzima carbamoil fosfato sintetase I (CPS I) é encontrada na mitocôndria e primariamente no fígado; uma segunda enzima, CPS II, é encontrada no citosol e em praticamente todos os tecidos. Embora o produto de ambas as enzimas seja o mesmo, chamado de carbamoil fosfato, as enzimas são derivadas de genes diferentes e funcionam na ureogênese (CPS I) ou biossíntese de pirimidina (CPS II), respectivamente. Outras diferenças entre as duas enzimas incluem suas fontes de nitrogênio (NH_3 para a CPS I e glutamina para CPS II) e seu requerimento por *N*-acetilglutamato (requerido pela CPS I, mas não pela CPS II). Sob circunstâncias normais, as CPS I e II funcionam independentemente e em compartimentos celulares

diferentes; no entanto, quando o ciclo da ureia é bloqueado, por exemplo, como resultado de uma deficiência na ornitina transcarbamoilase, o carbamoil fosfato mitocondrial acumulado passa para o compartimento citosólico e pode estimular em excesso a síntese de pirimidina, resultando no acúmulo de ácido orótico no sangue e na urina.



Quadro de conceitos avançados

Encefalopatia causada pela amônia

Os mecanismos envolvidos na toxicidade da amônia — em particular a encefalopatia — não são bem definidos. Está claro, no entanto, que quando sua concentração se eleva no sangue e em outros fluidos biológicos, a amônia se difunde para dentro das células e atravessa a barreira hematoencefálica. O aumento de amônia causa um aumento na síntese de glutamato a partir de α-cetoglutarato e aumenta a síntese de glutamina. Embora essa seja uma reação de desintoxicação normal das células, quando as concentrações de amônia estão significantemente aumentadas, o fornecimento de α-cetoglutarato nas células do SNC pode se esgotar, resultando na inibição do ciclo do TCA e na diminuição da produção de ATP. Pode haver mecanismos adicionais responsáveis pelo comportamento estranho observado em indivíduos com altas concentrações de amônia no sangue. Tanto o glutamato, o principal neurotransmissor inibitório, quanto seu derivado, o ácido γ-aminobutírico (GABA), podem também contribuir para os efeitos sobre o SNC.



Quadro clínico

Hiperamonemia hereditária

Um bebê do sexo feminino com 5 meses e aparentemente saudável foi levado ao consultório de um pediatra por sua mãe, com a queixa de episódios periódicos de vômitos e com dificuldade de ganhar peso. A mãe também reportou que a criança podia oscilar entre períodos de irritabilidade e letargia. Um exame e os resultados de laboratório subsequentes revelaram um eletroencefalograma anormal, um aumento acentuado da concentração de amônia no plasma (323 mmol/L, 550 mg/dL; a variação normal é de 15-88 mmol/L, 25-150 mg/dL) e concentrações acima do normal de glutamina, porém baixas concentrações de citrulina. O orotato, um nucleotídio precursor da pirimidina, foi encontrado na urina.

Comentário

O bebê foi admitido no hospital e tratado com fenilacetato e benzoato intravenosos, juntamente com arginina. O benzoato e o fenilacetato são metabolizados e conjugados à glicina e ao glutamato, os quais são excretados, com o seu conteúdo nitrogenado, na urina; a arginina estimula a atividade do ciclo da ureia residual. O bebê melhorou

rapidamente e recebeu alta do hospital com uma dieta pobre em proteínas e suplementação de arginina. Uma biopsia subsequente do fígado da paciente indicou que a atividade hepática da ornitina transcarbamoilase estava em cerca de 10% do normal.

Regulação do ciclo da ureia

O N-acetilglutamato, e indiretamente a arginina, é um regulador alostérico essencial do ciclo da ureia

O ciclo da ureia é regulado em parte pelo controle da concentração de ***N*-acetilglutamato,** o ativador alostérico essencial da CPS I. A arginina é um ativador alostérico de *N*-acetilglutamato sintase e é também uma fonte de ornitina (via arginase) para o ciclo da ureia. As concentrações das enzimas do ciclo da ureia também aumentam ou diminuem em resposta a uma dieta rica ou pobre em proteínas. A síntese e excreção da ureia estão diminuídas e a excreção de NH_4^+ é aumentada durante a acidose, como um mecanismo para excretar prótons pela urina. Por último, deve ser notado que durante o jejum a proteína é degradada para liberar os aminoácidos que são utilizados na gliconeogênese. O aumento da degradação de proteína durante o jejum resulta no aumento da síntese e excreção da ureia, um mecanismo para eliminar o nitrogênio liberado.



Quadro clínico

Doença de parkinson

Um homem até então saudável, com 60 anos, reparou em um tremor ocasional em seu braço esquerdo quando estava relaxado assistindo televisão. Ele também notou câimbras musculares ocasionais em sua perna esquerda, e sua esposa observou que ele apresentava ocasionalmente um olhar fixo como se estivesse em transe. Um exame físico completo e uma consulta com o neurologista confirmaram o diagnóstico de doença de Parkinson. Foi prescrita uma medicação contendo l-di-hidroxifenilalanina (l-DOPA) e um inibidor da monoamina oxidase (MAOI). A l-DOPA é um precursor do neurotransmissor dopamina, enquanto a monoamina oxidase é a enzima responsável pela desaminação oxidativa e degradação da dopamina. Seus sintomas melhoraram imediatamente, mas gradualmente ele apresentou efeitos colaterais significativos decorrentes da medicação, especialmente a ocorrência de movimentos involuntários.

Comentário

A doença de Parkinson é causada pela morte das células produtoras de dopamina na substância nigra e no *locus* cerúleo. Embora a medicação possa reduzir acentuadamente os sintomas, a doença é progressiva e pode resultar em uma incapacidade grave. Os agonistas dopaminérgicos normalmente possuem efeitos colaterais e também possuem um efeito limitado sobre o tremor, tanto que outros tratamentos, como a estimulação cerebral profunda ou a ablação, são utilizados em

casos selecionados. A monoamina oxidase também está envolvida na desaminação de outras aminas no cérebro, tanto que as MAOIs têm efeitos colaterais indesejados. O transplante de tecido fetal dopaminérgico para o cérebro tem sido testado, mas é atualmente um tratamento experimental controverso.

Defeitos em qualquer uma das enzimas do ciclo da ureia têm sérias consequências. Bebês que nascem com defeitos em qualquer uma das primeiras quatro enzimas dessa via podem parecer normais ao nascimento, porém rapidamente se tornam letárgicos e hipotérmicos, e podem ter dificuldades para respirar. As concentrações sanguíneas de amônia aumentam rapidamente, seguidas pelo edema cerebral. Os sintomas são mais graves quando as primeiras etapas do ciclo são afetadas. No entanto, um defeito em qualquer uma das enzimas dessa via é um problema sério e pode causar a hiperamonemia e levar rapidamente a um edema no SNC, coma e morte. A ornitina transcarbamoilase é o mais comum desses defeitos no ciclo da ureia e exibe uma herança paterna ligada ao X. O restante dos defeitos conhecidos associados ao ciclo da ureia são autossômicos recessivos. Uma deficiência na arginase, a última enzima do ciclo, produz sintomas menos graves, mas apesar disso é caracterizada por concentrações aumentadas de arginina no sangue e ao menos um aumento moderado de amônia no sangue. A hemodiálise deve ser usada em indivíduos com altas concentrações de amônia no sangue, frequentemente seguida pela administração intravenosa de benzoato de sódio e fenilactato. Esses compostos se conjugam à glicina e à glutamina, respectivamente, para formar adutos solúveis em água, transformando a amônia em uma forma atóxica, que pode ser excretada na urina.



Quadro de teste clínico

Triagem dos defeitos metabólicos dos aminoácidos em recém-nascidos

Atualmente, na maioria dos países desenvolvidos é coletada rotineiramente uma gota do sangue de bebês recém-nascidos, em um papel filtro e, então, é testada para uma série de compostos que são marcadores de doenças metabólicas hereditárias. O número de marcadores testados pode variar de estado para estado nos EUA, mas geralmente varia entre 10 e 30. Devido à necessidade de uma triagem rápida, do tamanho pequeno da amostra e da redução do custo, a metodologia mais antiga está sendo rapidamente substituída por uma tecnologia (Cap. 36) que utiliza cromatografia líquida ou gasosa com espectrometria de massa para medir o nível de múltiplos marcadores simultaneamente. A velocidade e a alta capacidade de rendimento desta tecnologia **metabolômica** permitem a triagem rápida de 20 ou mais marcadores, a partir de gotas de sangue secas, e a identificação dos bebês que são vítimas potenciais desses erros inatos do metabolismo. Essa tecnologia também é aplicada para analisar amostras de urina.

O conceito do balanço nitrogenado

Um balanço cuidadoso é mantido entre a ingestão e a secreção de nitrogênio

Por não existir uma forma significativa de armazenamento de nitrogênio ou de compostos aminados nos seres humanos, o metabolismo do nitrogênio é muito dinâmico. Em uma dieta saudável e regular, o conteúdo proteico excede as quantidades necessárias para o suprimento de aminoácidos essenciais e não essenciais para a síntese de proteínas, e a quantidade de nitrogênio excretada é aproximadamente igual à que foi consumida. Desse modo, um adulto saudável poderia dizer que está em "balanço nitrogenado". Quando existe a necessidade de aumentar a síntese proteica, como ocorre na recuperação de um trauma ou em uma criança em fase de crescimento rápido, a quantidade de nitrogênio excretada é menor do que a consumida na dieta, e o indivíduo está em "balanço nitrogenado positivo". O inverso é verdadeiro na desnutrição proteica: devido à necessidade de sintetizar as proteínas corporais essenciais, outras proteínas, particularmente as proteínas musculares, são degradadas e é perdido mais nitrogênio do que é consumido na dieta. Esse indivíduo está em "balanço nitrogenado negativo". O jejum, a inanição e o diabetes mal controlado também são caracterizados pelo equilíbrio negativo de nitrogênio, uma vez que a proteína corporal é degradada em aminoácidos e seus esqueletos de carbonos são utilizados na gliconeogênese. O conceito de balanço nitrogenado é clinicamente importante porque nos lembra o *turnover* contínuo de aminoácidos e proteínas no corpo (Cap. 22).

Metabolismo dos esqueletos de carbono dos aminoácidos

O metabolismo dos aminoácidos está inter-relacionado com o metabolismo dos carboidratos e lipídios

Quando se examina o metabolismo dos esqueletos de carbono dos 20 aminoácidos comuns, existe uma óbvia inter-relação com o metabolismo dos carboidratos e lipídios. Na prática, todos os carbonos podem ser convertidos em intermediários da via glicolítica, do ciclo do TCA ou do metabolismo dos lipídios. A primeira etapa desse processo é a transferência de um grupo α-amino através da transaminação para o α-cetoglutarato ou oxalacetato, fornecendo glutamato e aspartato, as fontes dos átomos de nitrogênio para o ciclo da ureia (Fig. 19.9). A única exceção a essa regra é a lisina, que não sofre transaminação. Embora os detalhes das vias variem para os diversos aminoácidos, a regra geral é que existe a perda do grupo amino, seguida ou pelo metabolismo direto em uma via central (glicólise, ciclo do TCA ou metabolismo dos corpos cetônicos), ou por uma ou mais conversões intermediárias a fim de produzir um metabólito para uma das vias centrais. Exemplos de aminoácidos que seguem o primeiro esquema incluem a alanina, o glutamato e o aspartato, que produzem piruvato, α- -cetoglutarato e oxalacetato, respectivamente. Os aminoácidos de cadeia ramificada, leucina, valina e isoleucina, e os aminoácidos aromáticos, tirosina, triptofano e fenilalanina, são exemplos do último esquema e de vias mais complexas.

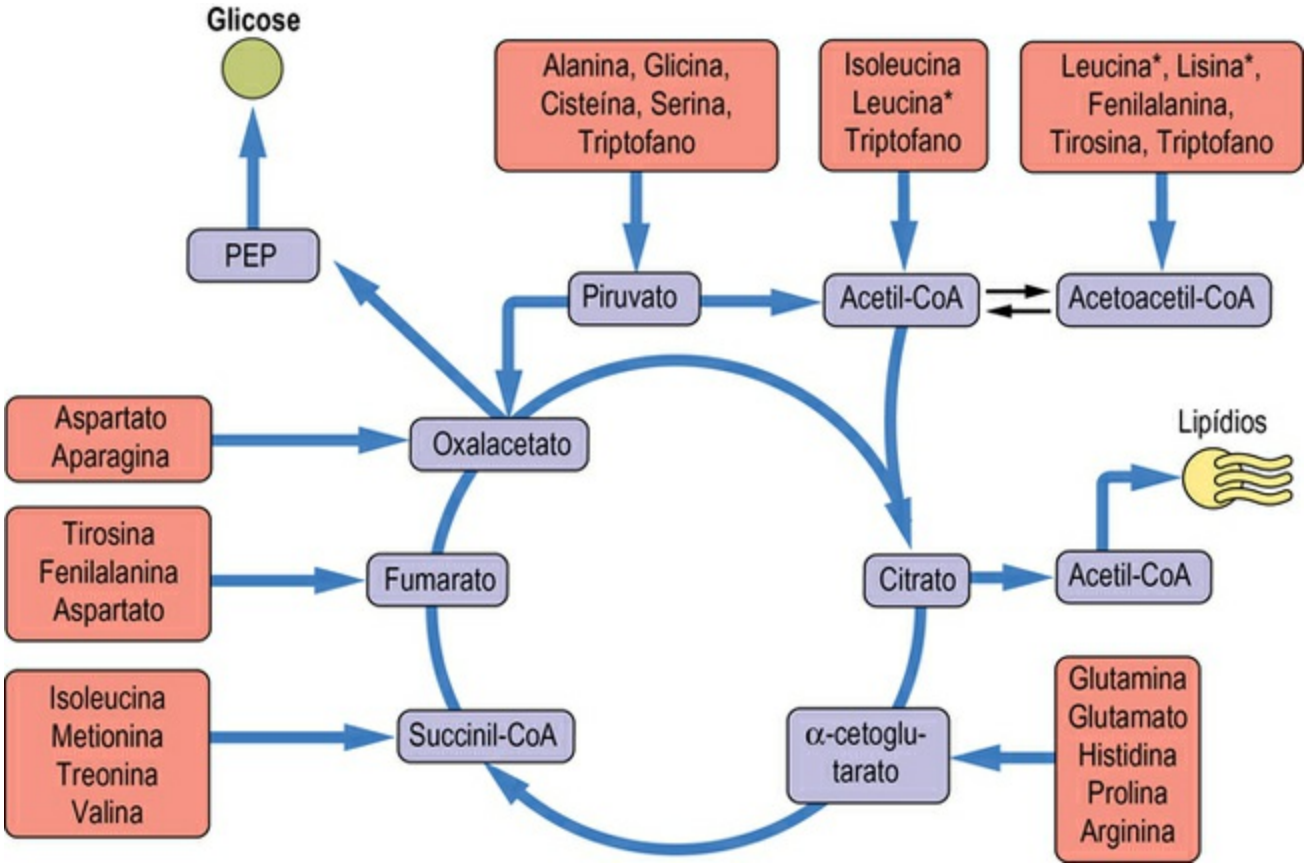


FIG. 19.9 Metabolismo de aminoácido e vias metabólicas centrais. Esta figura resume as interações entre o metabolismo de aminoácido e as vias metabólicas centrais. *Os aminoácidos marcados com um asterisco são cetogênicos somente. PEP, fosfoenolpiruvato.

Os aminoácidos podem ser glicogênicos ou cetogênicos

Dependendo do ponto no qual os carbonos de um aminoácido entram no metabolismo central, esse aminoácido pode ser considerado **glicogênico** ou **cetogênico,** isto é, possui a capacidade de aumentar as concentrações tanto de glicose quanto de corpos cetônicos, respectivamente, quando dados a um animal. Aqueles aminoácidos que fornecem carbonos para o ciclo do TCA no nível do α-cetoglutarato, succinil-CoA, fumarato ou oxalacetato, e aqueles que produzem piruvato podem aumentar a síntese líquida de glicose via gliconeogênese e são, portanto, designados glicogênicos. Aqueles aminoácidos que fornecem carbonos para o metabolismo central no nível da acetil-CoA ou acetoacetil-CoA são considerados cetogênicos. Devido à natureza do ciclo do TCA, não pode ocorrer fluxo líquido de carbonos entre o acetato ou seu equivalente (p. ex., butirato ou acetoacetato) de aminoácidos cetogênicos para a glicose via gliconeogênese (Cap. 13).

Muitos aminoácidos, especialmente aqueles com estruturas mais complexas ou aromáticas, podem produzir tanto fragmentos glicogênicos quanto cetogênicos (Fig. 19.9). Apenas os aminoácidos leucina e lisina são considerados como sendo exclusivamente cetogênicos e, devido ao seu metabolismo complexo e à incapacidade de sofrer transaminação, alguns autores não consideram a lisina como sendo exclusivamente cetogênica. Essas classificações podem ser resumidas como segue:

- **Aminoácidos glicogênicos:** alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, cistina, glutamina, ácido glutâmico, glicina, histidina, metionina, prolina, serina, valina.

- **Aminoácidos cetogênicos:** leucina, lisina.
- **Aminoácidos tanto cetogênicos quanto glicogênicos:** isoleucina, fenilalanina, treonina, triptofano, tirosina.



Quadro clínico

Homocistinúria

Um homem de 21 anos foi admitido no hospital após um episódio de perda da fala e fraqueza acentuada no seu lado direito. O diagnóstico de acidente vascular encefálico isquêmico foi realizado e o paciente foi tratado com terapia anticoagulante e melhorou. Os resultados laboratoriais indicaram níveis substancialmente elevados de homocisteína no sangue. O paciente teve uma recuperação significativa e teve alta com uma dieta modificada, juntamente com suplementos de vitamina B_6, ácido fólico e vitamina B_{12}.

Comentário

A homocistinúria é uma condição autossômica recessiva relativamente rara (1 em 200.000 nascimentos) que resulta em uma variedade de sintomas, incluindo retardo mental, problemas de visão, acidentes vasculares encefálicos trombóticos e doença na artéria coronária em idade precoce. Essa condição é causada pela falta da enzima que catalisa a transferência do enxofre da homocisteína para a serina através da formação de um intermediário de cistationina. Alguns desses pacientes respondem à suplementação vitamínica.

- Níveis moderadamente elevados de homocisteína no plasma estão implicados no desenvolvimento da doença cardiovascular e episódios de isquemia cerebrovascular (acidente vascular encefálico). Estudos transversais e retrospectivos sugerem que mesmo níveis moderadamente elevados de homocisteína podem estar relacionados com o aumento da incidência de doença cardíaca e acidente vascular encefálico, porém ainda não se sabe se a diminuição dos níveis de homocisteína irá reduzir o desenvolvimento dessas patologias graves.

Metabolismo dos esqueletos de carbono de aminoácidos selecionados

Os 20 aminoácidos são metabolizados por vias metabólicas complexas a vários intermediários no metabolismo de carboidratos e lipídios

Alanina, aspartato e glutamato são exemplos de aminoácidos glicogênicos. Em cada caso, através de um dos dois, transaminação ou desaminação oxidativa, o α-cetoácido resultante é um precursor direto do oxalacetato para as vias metabólicas centrais. O oxalacetato pode então ser convertido em PEP, e subsequentemente em glicose, via

gliconeogênese. Outros aminoácidos glicogênicos alcançam o ciclo do TCA ou intermediários metabólicos relacionados através de várias etapas, após a remoção do grupo amino (Fig. 19.10).

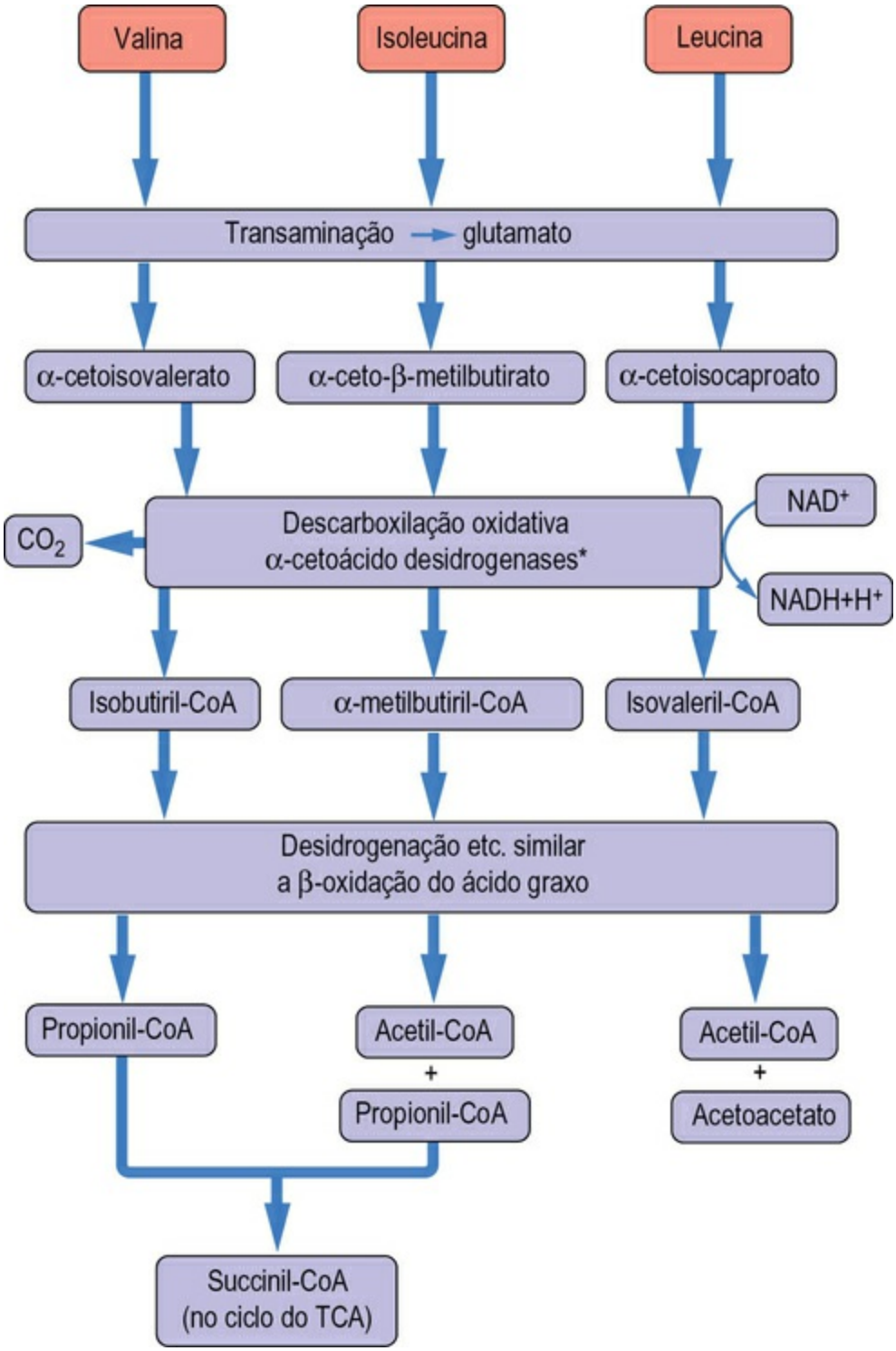


FIG. 19.10 Degradação dos aminoácidos de cadeia ramificada. O metabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada produz acetil-CoA e acetoacetato. No caso da valina e da isoleucina, o propionil-CoA é produzido e metabolizado, em duas etapas, em succinil-CoA (Fig. 15.5). *As desidrogenases de aminoácidos de cadeia ramificada são estruturalmente relacionadas à piruvato desidrogenase e à α-cetoglutarato desidrogenase, e utilizam os cofatores pirofosfato de tiamina, ácido lipoico, flavina adenina dinucleotídio, NAD^+ e CoA.

A leucina é um exemplo de aminoácido cetogênico. Seu catabolismo começa com a

transaminação para produzir 2--cetoisocaproato. O metabolismo de 2-cetoisocaproato requer a descarboxilação oxidativa por um complexo desidrogenase para produzir isovaleril-CoA. O metabolismo posterior da isovaleril-CoA leva à formação de 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA, um precursor tanto da acetil-CoA quanto dos corpos cetônicos. O metabolismo da leucina e de outros aminoácidos de cadeia ramificada está resumido na Figura 19.10. A propionil-CoA derivada da degradação do aminoácido ou do metabolismo do ácido graxo de cadeia ímpar é convertida em succinil-CoA (Fig. 15.5).

O triptofano é um bom exemplo de aminoácido que produz tanto precursores glicogênicos quanto cetogênicos. Após a clivagem do seu anel heterocíclico e um conjunto complexo de reações, o núcleo da estrutura do aminoácido é liberado como alanina (um precursor glicogênico), enquanto o restante dos carbonos é, ao final, convertido em glutaril-CoA (um precursor cetogênico). A Figura 19.11 resume os pontos-chave do catabolismo dos aminoácidos aromáticos.

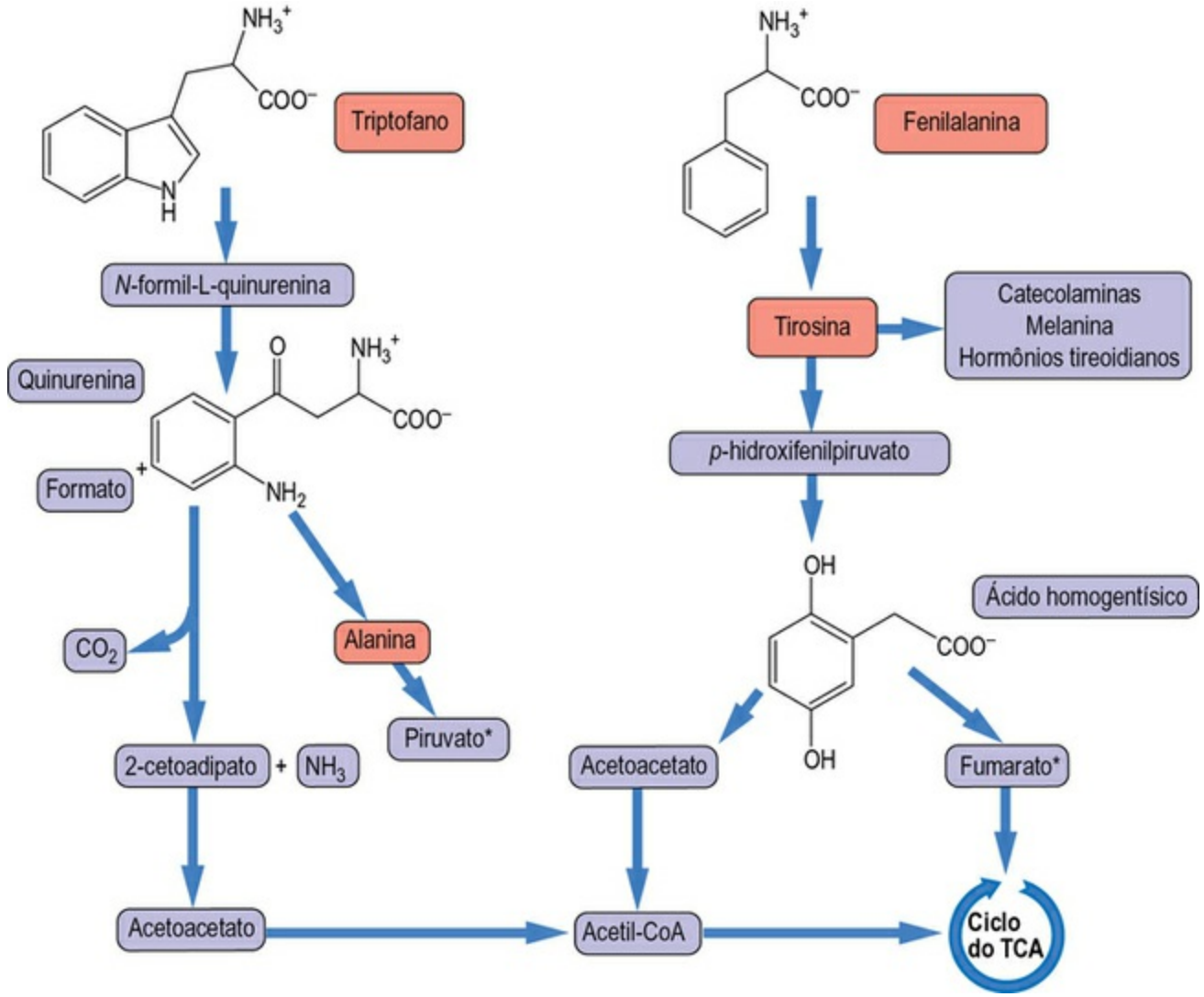


FIG. 19.11 Catabolismo dos aminoácidos aromáticos. Esta figura resume o catabolismo dos aminoácidos aromáticos, ilustrando as vias que conduzem aos precursores cetogênicos e glicogênicos derivados tanto da tirosina quanto do triptofano. *Tanto o piruvato quanto o fumarato podem levar à síntese líquida de glicose. Eles constituem as porções gliconeogênicas do metabolismo desses aminoácidos.

Biossíntese de aminoácidos

A evolução deixou nossas espécies incapazes de sintetizar quase metade dos aminoácidos requeridos na síntese de proteínas e outras biomoléculas

Os seres humanos utilizam 20 aminoácidos para formarem os peptídios e as proteínas que são essenciais para as muitas funções de suas células. A biossíntese dos aminoácidos envolve a síntese dos esqueletos de carbonos para os α-cetoácidos correspondentes, seguida pela adição do grupo amino via transaminação. No entanto, os seres humanos são capazes de realizar a biossíntese dos esqueletos de carbono de apenas cerca de metade desses α-cetoácidos. Os aminoácidos que nós não podemos sintetizar são conhecidos como **aminoácidos essenciais** e são requeridos na dieta. Embora quase todos os aminoácidos possam ser classificados claramente como essenciais ou não essenciais, alguns necessitam de uma qualificação adicional. Por exemplo, apesar de a cisteína não ser geralmente considerada um aminoácido essencial, porque ela pode ser derivada de um aminoácido não essencial, a serina, o seu enxofre tem que vir de um aminoácido essencial ou necessário, a metionina. Igualmente, o aminoácido tirosina não é requerido na dieta, mas tem que ser derivado do aminoácido essencial, a fenilalanina. Essa relação entre fenilalanina e tirosina será discutida posteriormente quando considerarmos a doença hereditária fenilcetonúria (PKU). As Tabelas 19.5 e 19.6 listam os aminoácidos essenciais e não essenciais e a fonte do esqueleto de carbono no caso dos que não são requeridos na dieta.

Tabela 19.5

Origens dos aminoácidos não essenciais

Aminoácido	Fonte no metabolismo etc.
Alanina	A partir do piruvato via transaminação
Ácido aspártico, asparagina, arginina, ácido glutâmico, glutamina, prolina	A partir de intermediários do ciclo do ácido cítrico
Serina	A partir do 3-fosfoglicerato (glicólise)
Glicina	A partir da serina
Cisteína*	A partir da serina; necessita do enxofre derivado da metionina
Tirosina*	Derivado a partir da fenilalanina via hidroxilação

*Estes são exemplos de aminoácidos não essenciais que dependem de quantidades adequadas de um aminoácido essencial.

Tabela 19.6

Aminoácidos essenciais da dieta

Mnemônica	Aminoácido*	Notas ou comentários
P	Fenilalanina	Necessária na dieta também como precursor da tirosina
V	Valina	Um dos três aminoácidos de cadeia ramificada
T	Treonina	Metabolizada como um aminoácido de cadeia ramificada
T	Triptofano	Sua cadeia lateral indol heterocíclica não pode ser sintetizada em seres humanos
I	Isoleucina	Um dos três aminoácidos de cadeia ramificada
M	Metionina	Fornece o enxofre para a cisteína e participa como um doador de metil no metabolismo; a homocisteína é reciclada
H	Histidina	Sua cadeia lateral imidazol heterocíclica não pode ser sintetizada em seres humanos
A	Arginina	Enquanto a arginina pode ser derivada a partir da ornitina, no ciclo da ureia, em quantidades suficientes para suprir as necessidades dos adultos, os animais em crescimento necessitam dela na dieta
L	Leucina	Um aminoácido puramente cetogênico
L	Lisina	Não sofre transaminação direta

*A regra mnemônica PVT TIM HALL é útil para recordar os nomes dos aminoácidos essenciais.



Quadro clínico

Histamina, anti-histamínicos e alergia

Uma criança do sexo masculino de 8 anos foi encaminhada para uma clínica de alergias devido a repetidos episódios de eczema com prurido intenso. Não tinha outros problemas de saúde conhecidos. Tratamentos anteriores consistiam em medicação oral anti-histamínica, que proporcionara algum alívio, mas não evitara a recorrência do problema. Após testes extensos, foi descoberto que enquanto os resultados eram marginalmente positivos para pelo de cachorro e gato e ácaros do pó da casa, eram fortemente positivos para a alergia ao tomate. A análise da dieta do menino (que gostava muito de pizza e espaguete com molho à base de tomate) forneceu uma relação de seus episódios de eczema com o consumo de produtos contendo tomate. Iniciou-se uma modificação alimentar no sentido de evitar produtos de tomate e seus sintomas se tornaram imediatamente menos frequentes e foram bem controlados com medicação oral anti-histamínica e o uso ocasional de cremes esteroides tópicos.

Esse é um bom exemplo tanto da importância da aplicação de testes alérgicos adequados quanto da importância dos anti-histamínicos no tratamento de reações alérgicas. Essa classe de medicamentos (atualmente, existem muitos disponíveis) atua por interferência com a interação da histamina com seu receptor ou inibição da produção de histamina a partir de seu precursor, o aminoácido histidina.

Os aminoácidos são precursores de muitos compostos essenciais

Além da sua função como blocos formadores de peptídios e proteínas, os aminoácidos são precursores essenciais de diversos neurotransmissores, hormônios, mediadores inflamatórios e de moléculas transportadoras e efetoras (Tabela 19.7). Exemplos disso incluem a histidina, que funciona como precursor da histamina (o mediador da inflamação liberado por mastócitos e linfócitos), o glutamato, a glicina e o aspartato, que funcionam diretamente como neurotransmissores. Exemplos adicionais incluem o ácido gama aminobutírico (GABA), que é derivado do glutamato, e a tirosina, que é derivada da fenilalanina. A tirosina é então o precursor dos neurotransmissores 1,3-di-hidroxifenilalanina (DOPA), da dopamina, da epinefrina, dos hormônios tireoidianos tri-iodotironina e tiroxina, e da melanina.

Tabela 19.7

Exemplos de aminoácidos como moléculas efetoras ou precursores

Aminoácido	Molécula efetora ou grupo prostético
Arginina	Precursor imediato da ureia, precursor de óxido nítrico
Aspartato	Um neurotransmissor excitatório
Glicina	Um neurotransmissor inibitório; precursor do heme
Glutamato	Neurotransmissor excitatório; precursor do ácido γ-aminobutírico (GABA), um neurotransmissor inibitório
Histidina	Precursor da histamina, um mediador da inflamação e um neurotransmissor
Triptofano	Precursor da serotonina, um potente estimulador da contração do músculo liso; precursor da melatonina, um regulador do ritmo circadiano
Tirosina	Precursor dos hormônios e neurotransmissores, catecolaminas, dopamina, epinefrina e norepinefrina, tiroxina

Doenças hereditárias do metabolismo de aminoácidos

Além das deficiências no ciclo da ureia, os defeitos no metabolismo dos esqueletos de carbono de vários aminoácidos estão entre os primeiros estados patológicos a serem associados aos padrões de hereditariedade simples. Estas observações deram origem ao conceito das bases genéticas dos estados patológicos metabólicos hereditários, também conhecidos como **erros inatos do metabolismo.** Garrod considerou uma diversidade de estados patológicos que pareciam ser herdados em um padrão mendeliano, e propôs uma correlação entre essas anormalidades e genes específicos, na qual o estado patológico poderia ser tanto dominante quanto recessivo. Dezenas de erros inatos do metabolismo dos aminoácidos foram descritos até agora e o defeito molecular foi descrito para muitos deles. Três erros inatos clássicos do metabolismo serão discutidos em detalhe adiante.

Fenilcetonúria (PKU)

A forma comum de PKU resulta de uma deficiência na enzima fenilalanina hidroxilase. A hidroxilação da fenilalanina é uma etapa necessária em ambas, na degradação do esqueleto de carbono desse aminoácido e na síntese de tirosina (Fig. 19.12). Quando não é tratado, esse defeito metabólico leva à excreção urinária excessiva de fenilpiruvato e fenilactato e retardo mental grave. Além disso, indivíduos com PKU tendem a ter pouca pigmentação na pele, marcha, postura em pé e sentada incomuns e uma elevada frequência de epilepsia. Nos EUA, esse defeito autossômico recessivo ocorre em cerca de 1 em cada 30.000 nascidos vivos. Devido à sua frequência e à capacidade de prevenir as consequências mais sérias do defeito através de uma dieta pobre em fenilalanina, os recém-nascidos na maioria dos países desenvolvidos são testados rotineiramente quanto às concentrações sanguíneas de fenilalanina. Felizmente, com a detecção precoce e a utilização de uma dieta restrita de fenilalanina, porém suplementada com tirosina, a maior parte do retardo mental pode ser evitada. As mães que são homozigotas para esse defeito têm uma probabilidade muito elevada de gerarem filhos com defeitos congênitos e retardo mental a menos que suas concentrações sanguíneas de fenilalanina possam ser controladas por meio da dieta. O feto em desenvolvimento é muito sensível aos efeitos tóxicos das altas concentrações de fenilalanina e fenilcetonas relacionadas. Nem todas as hiperfenilalaninemias são causadas por um defeito na fenilalanina hidroxilase. Em alguns casos, ocorre defeito na biossíntese ou redução de um cofator necessário, a tetra-hidrobiopterina.

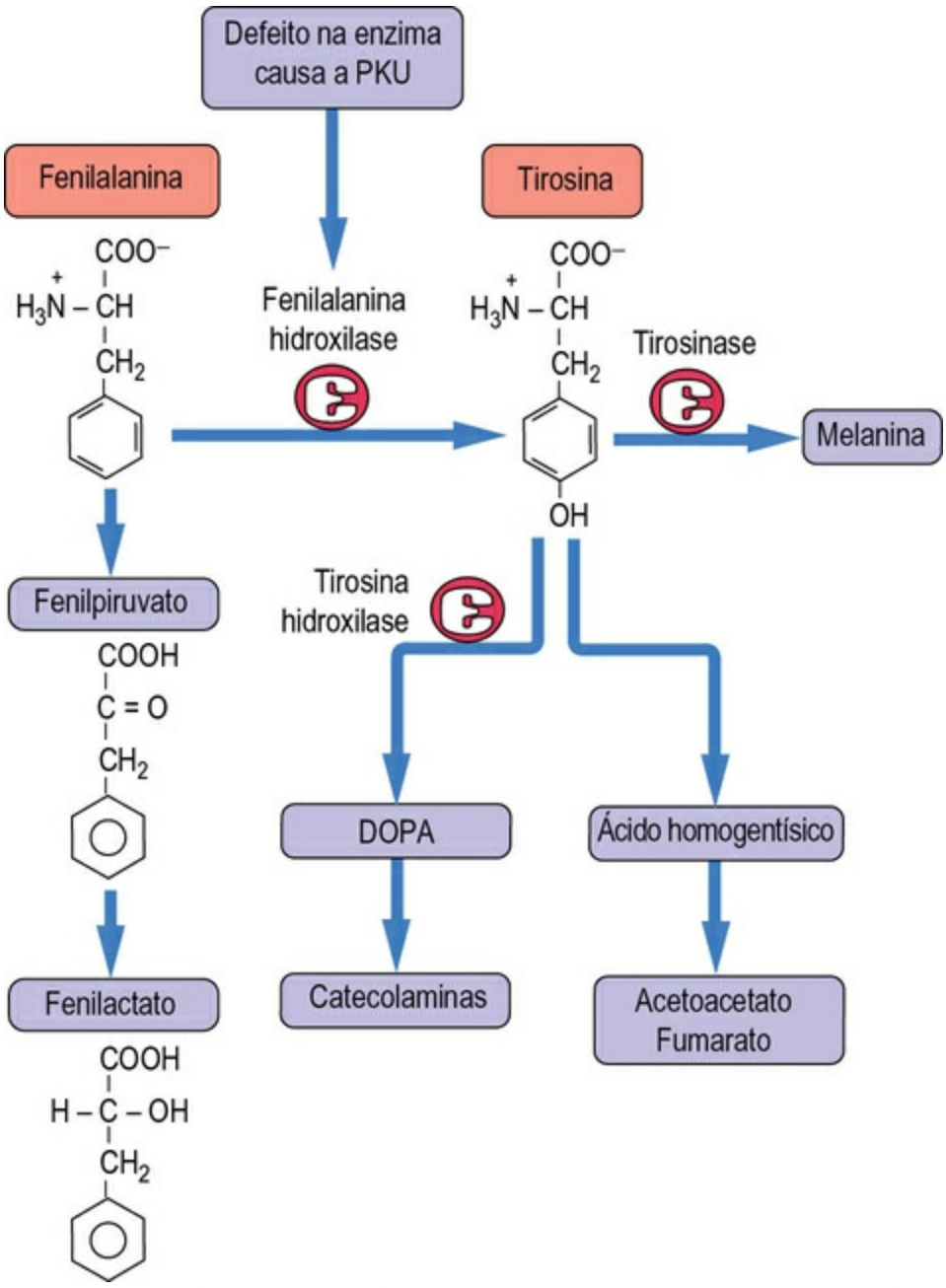


FIG. 19.12 Degradação da fenilalanina. A fim de entrar no metabolismo normal, a fenilalanina tem de ser hidroxilada pela enzima fenilalanina hidroxilase. Um defeito nessa enzima leva à fenilcetonúria (PKU). A tirosina é um precursor da acetil-CoA e do fumarato, dos hormônios catecolamina, do neurotransmissor dopamina e do pigmento melanina. DOPA, di-hidroxifenilalanina.

Alcaptonúria (doença da urina preta)

Um segundo defeito hereditário na via da fenilalanina-tirosina envolve uma deficiência na enzima que catalisa a oxidação do ácido homogentísico, um intermediário no catabolismo da tirosina e da fenilalanina. Nessa patologia, que ocorre em 1 em 1.000.000 de nascidos vivos, o ácido homogentísico se acumula e é excretado na urina. Esse composto oxida a alcaptona com o tempo ou por tratamento com substâncias alcalinas, e confere uma cor escura à urina. Por fim, indivíduos com **alcaptonúria** sofrem com a deposição do pigmento escuro (cor de ocre) no tecido cartilaginoso, com subsequente dano tecidual, incluindo artrite grave; o aparecimento desses sintomas ocorre geralmente na terceira ou quarta década de vida. Essa doença autossômica recessiva foi a primeira de

muitas que Garrod considerou ao propor sua hipótese inicial para os erros inatos do metabolismo. Apesar de a alcaptonúria ser relativamente benigna comparada à PKU, há poucos tratamentos disponíveis, além do alívio sintomático.



Quadro clínico

Albinismo

Observou-se que um bebê nascido no tempo certo, filho de mãe e pai normais e saudáveis, apresentava uma redução acentuada de pigmentação. O bebê, que fora isso aparentava ser normal, tinha olhos azuis e um cabelo louro muito claro, quase branco. Essa ausência de pigmentação foi confirmada como albinismo clássico com base na história familiar e no estabelecimento da ausência da enzima tirosinase, que é responsável pela hidroxilação em duas etapas da tirosina em di-hidroxifenilalanina (DOPA) e a subsequente oxidação adicional em quinona, um precursor da melanina nos melanócitos.

Comentário

A causa primária do albinismo é um defeito homozigoto na tirosinase ou em uma proteína P acessória. Uma enzima produtora de DOPA independente, a tirosina hidroxilase, está envolvida na biossíntese de neurotransmissores catecolaminas, pelo que os albinos não aparentam ter déficits neurológicos. Como resultado de sua ausência de pigmentação, no entanto, eles são muito sensíveis a danos provocados pela luz solar e devem ter cuidados adicionais contra a radiação ultravioleta solar. Os albinos são geralmente muito sensíveis à luz intensa. Podem ter visão normal, apesar da ausência de pigmentação — os pigmentos da retina derivam do caroteno (vitamina A), e não da tirosina.

Doença da urina em xarope de bordo (MSUD)

O metabolismo normal dos aminoácidos de cadeia ramificada, leucina, isoleucina e valina envolve a perda do grupo α-amina, seguida pela descarboxilação oxidativa do α-cetoácido resultante. Essa etapa da descarboxilação é catalisada pela cetoácido descarboxilase de cadeia ramificada, um complexo multienzimático associado à membrana interna da mitocôndria. Em aproximadamente 1 em 300.000 nascidos vivos, um defeito nessa enzima leva ao acúmulo do cetoácido correspondente a esse aminoácido de cadeia ramificada no sangue e, assim, à cetoacidúria de cadeia ramificada. Quando não é tratada ou controlada, essa patologia pode levar tanto a um retardo mental quanto físico do recém-nascido e ao odor característico de xarope de bordo na urina. Esse defeito pode ser parcialmente controlado com uma dieta modificada ou pobre em proteínas, mas não em todos os casos. Em alguns casos, a suplementação com altas doses de pirofosfato de tiamina, um cofator para este complexo enzimático, tem sido útil.

Quadro de conceitos avançados

Selenocisteína

Além dos 20 aminoácidos comuns encontrados nas proteínas, um 21° aminoácido foi descoberto e demonstrou ser um aminoácido de sítio ativo em diversas enzimas, incluindo a enzima antioxidante glutationa peroxidase (Cap. 37) e 5'-deiodinases (importantes no metabolismo dos hormônios da tireoide) (Fig. 39.8). A selenocisteína é derivada da serina e tem propriedades químicas únicas. É devido à necessidade de selenocisteína que são requeridas pequenas quantidades de selênio na dieta. Deve notar-se que, enquanto a selenocisteína é incorporada *per se* nas enzimas nas quais funciona, vários outros aminoácidos incomuns podem ser encontrados em algumas proteínas devido a modificação pós-tradução. Exemplos disso podem ser encontrados nos colágenos e proteínas do tecido conjuntivo, que contêm formas hidroxiladas de prolina e lisina, as quais se formam após a incorporação da prolina e da lisina no polipeptídio da proteína (Cap. 29).

Quadro clínico

Cistinúria

Um homem de 21 anos veio para a sala de emergência com uma dor intensa em seu lado direito e nas costas. Uma investigação subsequente indicou um cálculo renal e concentrações elevadas de cistina, arginina e lisina na urina. Esse paciente apresentava os sintomas característicos da cistinúria.

Comentário

A cistinúria é um distúrbio autossômico recessivo da absorção intestinal e da reabsorção tubular proximal dos aminoácidos dibásicos; ela não resulta de um defeito no metabolismo da cisteína *per se*. Devido à deficiência no transporte, a cisteína, que é normalmente reabsorvida no túbulo renal proximal, permanece na urina. A cisteína se oxida espontaneamente à sua forma de dissulfeto, a cistina. A cistina é relativamente insolúvel e tende a se precipitar no trato urinário, formando os cálculos renais. A patologia é geralmente tratada através da restrição do consumo de metionina na dieta (um precursor biossintético da cisteína) e da estimulação do consumo elevado de líquidos para manter a urina diluída, e, mais recentemente, com fármacos que convertem a cisteína urinária em um composto mais solúvel que não se precipita.

Resumo

Neste capítulo, vimos que o metabolismo dos aminoácidos está integralmente relacionado com o objetivo final do metabolismo.

- O catabolismo dos aminoácidos começa, geralmente, com a remoção do grupo α-

amino, que é transferido para o α-cetoglutarato e o oxalacetato e por último é excretado sob a forma de ureia.

- Os esqueletos de carbono resultantes são convertidos em intermediários que entram no metabolismo central em vários pontos.
- Pelo fato de os esqueletos de carbono correspondentes aos vários aminoácidos poderem ser derivados ou alimentarem a via glicolítica, o ciclo do TCA, a biossíntese de ácidos graxos e a gliconeogênese, o metabolismo do aminoácido não deve ser considerado como uma via isolada.
- Embora os aminoácidos não possam ser armazenados como a glicose (glicogênio) ou os ácidos graxos (triglicerídios), eles têm uma função importante e dinâmica, não apenas no fornecimento de blocos formadores para a síntese e *turnover* de proteínas, mas também no metabolismo energético normal, fornecendo uma fonte de carbono para a gliconeogênese, quando necessário, e uma fonte de energia, como último recurso na inanição.
- Os aminoácidos fornecem os precursores para a biossíntese de uma diversidade de pequenas moléculas sinalizadoras, incluindo hormônios e neurotransmissores.
- As consequências graves das doenças hereditárias como a fenilcetonúria e a doença da urina em xarope de bordo ilustram os efeitos do metabolismo anormal dos aminoácidos.

Questões para aprendizagem

1. A tirosina é incluída como um suplemento no planejamento da dieta para indivíduos com fenilcetonúria. Qual é o motivo para essa suplementação? Compare as abordagens terapêuticas utilizadas para o tratamento das várias formas de PKU nas quais a fenilalanina hidroxilase não está afetada.
2. Revise o motivo da utilização de levodopa, inibidores da catecol- *O*-metiltransferase e inibidores da monoamina oxidase no tratamento da doença de Parkinson.
3. Revise as vias da biossíntese dos neurotransmissores serotonina, melatonina, dopamina e as catecolaminas. Quais enzimas estão envolvidas na inativação desses compostos?

Leituras sugeridas

Dietzen, D. J., Rinaldo, P., Whitley, R. J., et al. National academy of clinical biochemistry laboratory medicine practice guidelines: follow-up testing for metabolic disease identified by expanded newborn screening using tandem mass spectrometry; executive summary. *Clin Chem*. 2009; 55:1615–1626.

Gropman, A. L., Summar, M., Leonard, J. V. Neurological implications of urea cycle disorders. *J Inherit Metab Dis*. 2007; 30:865–879.

Kuhara, T. Noninvasive human metabolome analysis for differential diagnosis of inborn errors of metabolism. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007; 855:42–50.

Mitchell, J. J., Trakadis, Y. J., Scriver, C. R. Phenylalanine hydroxylase deficiency. *Genet Med*. 2011; 13:697–707.

Morris, S. M., rJr. Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Annu Rev Nutr*. 2002; 22:87–105.

Morris, S. M., rJr. Arginine: beyond protein. *Am J Clin Nutr*. 2006; 83(suppl):508S–512S.

Lindemann, B., Ogiwara, Y., Ninomiya, Y. The discovery of Umami. *Chem Senses*. 2002; 27:843–844.

Ogier de Baulny, H., Saudubray, J. M. Branched-chain organic acidurias. *Semin Neonatal*. 2002; 7:65–74.

Saudubray, J. M., Nassogne, M. C., de Lonlay, P., et al. Clinical approach to inherited metabolic disorders in neonates: an overview. *Semin Neonatal*. 2002; 7:3–15.

Singh, R. H. Nutritional management of patients with urea cycle disorders. *J Inherit Metab Dis*. 2007; 30:880–887.

Summar, M. L., Dobbelaere, D., Brusilow, S., et al. Diagnosis, symptoms, frequency and mortality of 260 patients with urea cycle disorders from a 21-year, multicentre study of acute hyperammonaemic episodes. *Acta Paediatr*. 2008; 97:1420–1425.

Wilcken, B. Screening for disease in the newborn: the evidence base for blood-spot screening. *Pathology*. 2012; 44:73–79.

Sites

Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism (SSIEM): www.ssiem.org.

Urea cycle disorders: www.uptodate.com/contents/urea-cycle-disorders-clinical-features-and-diagnosis

www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1217/

www.ureacycle.com

Nitrogen metabolism: http://themedicalbiochemistrypage.org/nitrogen-metabolism.html

Maple syrup urine disease: www.msud-support.org/overview.htm

Parkinson's disease: www.enotes.com/parkinsons-disease-reference/parkinsons-disease-172267

Phenylketonuria: www.nlm.nih.gov/medlineplus/phenylketonuria.html

CAPÍTULO 20

Músculo: Metabolismo Energético e Contração

John W. Baynes and Matthew C. Kostek

Objetivos

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever a estrutura do músculo e sua função na produção de força mecânica, incluindo as diferenças entre os tipos de músculos esquelético, cardíaco e liso que estão relacionadas com suas funções fisiológicas.
- Descrever a estrutura e composição proteica do sarcômero, o modelo do deslizamento de filamentos da contração muscular e a base para os padrões em bandas no músculo estriado. Descrever a sequência de eventos no acoplamento de excitação-contração, incluindo os papéis da despolarização da membrana, do retículo sarcoplasmático e do desencadeamento pelo cálcio.
- Identificar os sítios-chave de utilização de energia durante a contração muscular, o papel do fosfato de creatina no músculo esquelético e o impacto do tipo de fibra de músculo esquelético na utilização de substrato e na função muscular.
- Descrever as alterações na massa de músculo esquelético e no metabolismo que ocorrem com a idade, em resposta ao exercício agudo e prolongado e em doenças como a sarcopenia, a síndrome metabólica e condições consumptivas.

Introdução

Existem três tipos de músculo — músculo esquelético, cardíaco e liso —, cada um com um papel fisiológico único

Todos os músculos funcionam convertendo energia química em energia mecânica, mas os diversos tipos de músculo diferem em seu mecanismo de iniciação da contração, velocidade de desenvolvimento de força, duração da contração, capacidade de adaptação

ao seu ambiente e utilização de substratos. O músculo representa cerca de 40% da massa corporal total, e o metabolismo muscular é um grande determinante da taxa metabólica total, tanto no estado basal quanto em atividade. Ocorrem alterações no metabolismo do músculo esquelético com a atividade física, e estas estão diretamente relacionadas com a geração da força requerida e com a duração da atividade. Esses fatores também afetam a utilização muscular relativa de glicose e ácidos graxos como combustível. Além da locomoção, o músculo esquelético também é uma fonte de calor corporal, fornece aminoácidos para a gliconeogênese hepática durante o jejum e é um importante local de deposição de glicose e triglicerídios após a refeição. Devido ao seu papel crítico na regulação do fluxo sistêmico de combustíveis e do metabolismo, a perda de massa muscular tem um efeito profundo no metabolismo. O avançar da idade, a sepse e as doenças consumptivas, tais como a AIDS e o câncer, são condições associadas à perda de massa muscular, e essa perda está associada a morbidade e mortalidade aumentadas.

O enfoque primário deste capítulo será no músculo esquelético, suplementado por discussão das similaridades e diferenças na estrutura, função e metabolismo dos músculos esquelético, cardíaco e liso. O capítulo começará com uma discussão do mecanismo de contração muscular, prosseguirá para a sinalização que inicia o processo contrátil e, em seguida, examinará o metabolismo energético essencial para a contração.

Estrutura muscular

O sarcômero: a unidade funcional contrátil do músculo

Uma característica comum dos miócitos cardíacos, células do músculo liso e miofibras esqueléticas é que o seu citoplasma se encontra densamente preenchido com proteína contrátil. A proteína contrátil se organiza em arranjos lineares de unidades de sarcômero nas miofibras esqueléticas e nos miócitos cardíacos, conferindo a esses músculos um aspecto estriado; daí o termo **músculo estriado.** A proteína contrátil nas células do **músculo liso** não está organizada em uma estrutura de sarcômero, e este tecido é descrito como não estriado. A estrutura hierárquica do músculo esquelético (Fig. 20.1) consiste em feixes (fascículos) de células fibrosas alongadas, multinucleadas (miofibras). As células das miofibras contêm feixes de miofibrilas que são, por sua vez, constituídas por proteínas de miofilamentos, primariamente a miosina e a actina, que formam o sarcômero (Tabela 20.1). A análise do músculo por microscopia eletrônica revela um padrão repetitivo de regiões de coloração clara e escura na miofibrila (Fig. 20.2). Essas regiões são conhecidas como bandas I (isotrópicas) e A (anisotrópicas), respectivamente. No centro da banda I existe uma linha Z discreta, de coloração mais escura, enquanto o centro da banda A tem uma zona H de coloração mais clara, com uma linha M central. A unidade contrátil, o **sarcômero**, está centrada na linha M, estendendo-se desde uma linha Z até à seguinte. O músculo liso é desprovido de linha Z definida.

Tabela 20.1

Elementos estruturais do músculo esquelético organizados por ordem decrescente de tamanho

Unidade microscópica	Fascículo: feixe de células musculares
Unidade celular	Célula miofibrosa: célula longa, multinucleada
Unidade subcelular	Miofibrila: composta por proteínas miofilamentosas
Unidade funcional	Sarcômero: unidade contrátil, unidade repetida da miofibrila
Componentes miofilamentosos	Proteínas: principalmente actina e miosina

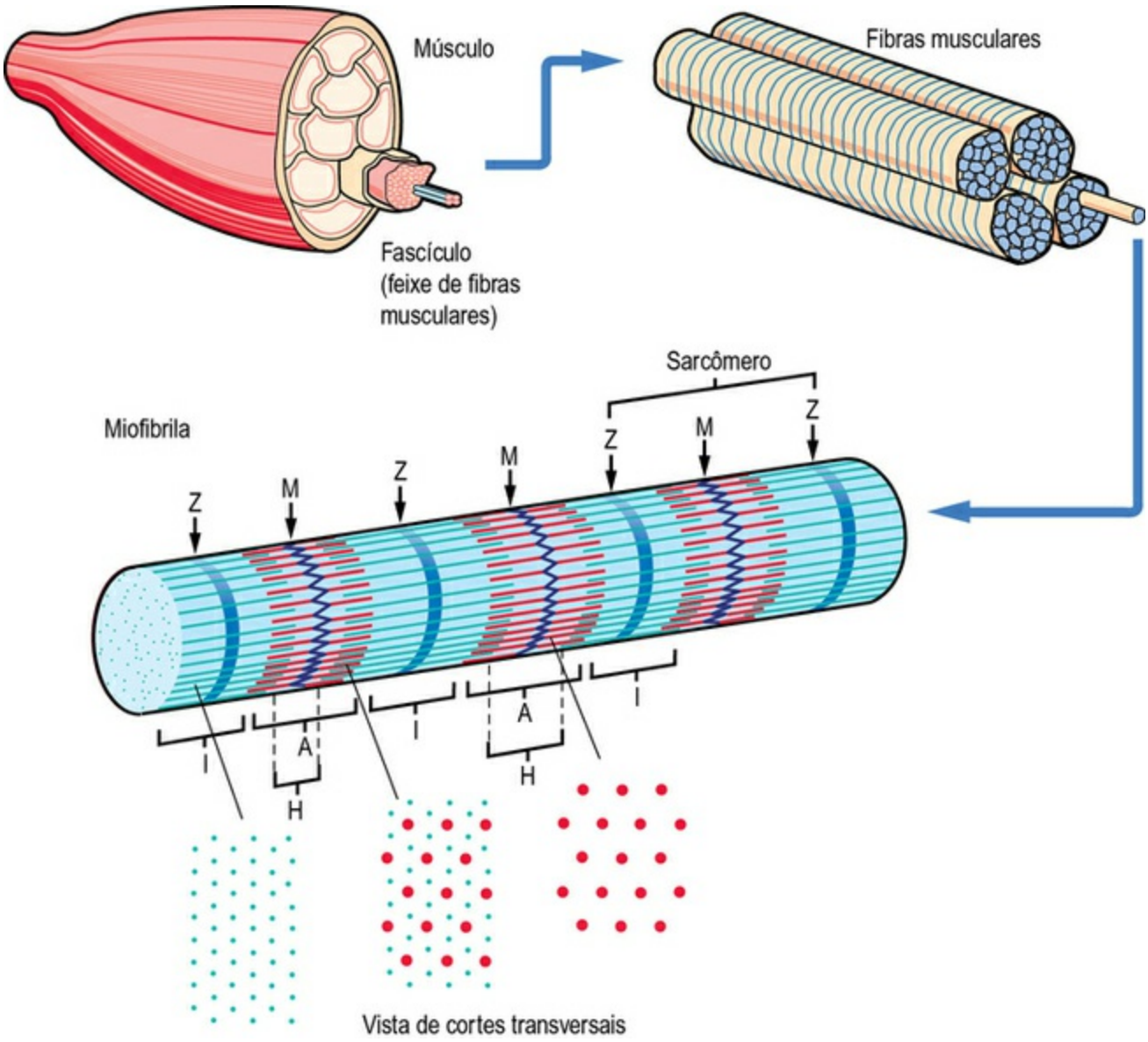


FIG. 20.1 Estrutura hierárquica do músculo.
Estrutura hierárquica do músculo esquelético, mostrando seu desdobramento gradual em fascículos, miofibras, miofibrilas e proteínas miofilamentosas. Localização da banda I (fina, filamentos de actina estendendo-se a partir da linha Z) e da banda A (grossa, filamentos de miosina estendendo-se a partir da linha M), com regiões de coloração mais escura de banda A correspondendo à região de sobreposição de filamentos de actina e miosina.

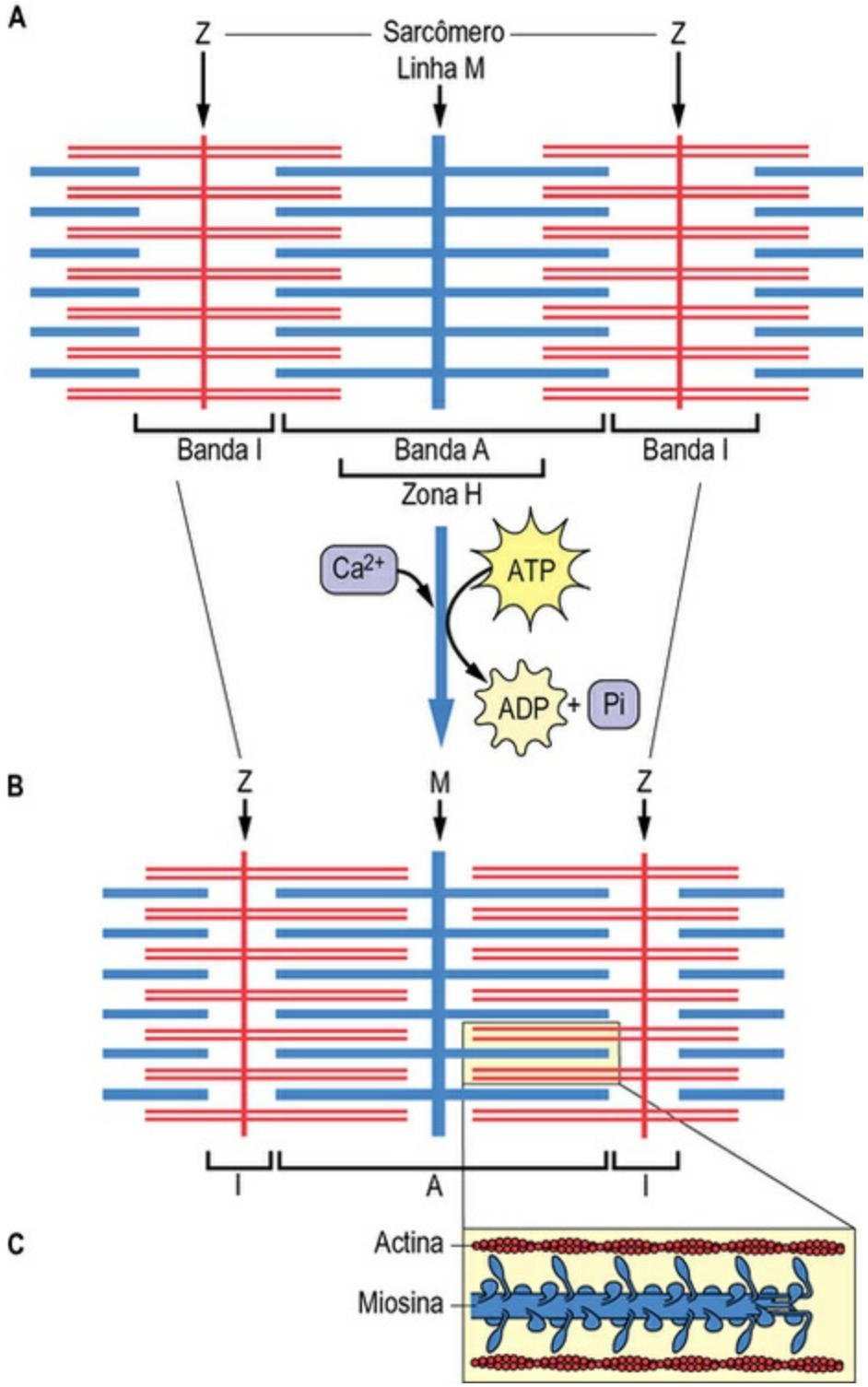


FIG. 20.2 Estrutura esquemática do sarcômero, indicando a distribuição de actina e miosina nas bandas A e I.
(A) Sarcômero relaxado. **(B)** Sarcômero contraído. **(C)** Ampliação do sarcômero contraído, ilustrando a polaridade dos arranjos de moléculas de miosina. O aumento da sobreposição de filamentos de actina e miosina durante a contração, acompanhado por um encurtamento das zonas H e bandas I, ilustra o modelo do deslizamento de filamentos da contração muscular.

Os filamentos espessos e finos

A Actina e a Miosina representam mais de 75% da proteína muscular

O sarcômero pode encurtar algo como 70% de seu comprimento durante a contração muscular (Fig. 20.2). Os componentes que efetuam a contração são os filamentos

espessos e finos. **O filamento espesso é composto pelas proteínas miosina e titina, e o filamento fino é principalmente constituído por actina, com as proteínas associadas, tropomiosina e troponinas.** O filamento fino também tem alguma interação com a titina. Os filamentos espessos e finos se estendem em direções opostas a partir de ambos os lados das linhas M e Z, respectivamente, e se sobrepõem e deslizam uns nos outros durante o processo contrátil (Fig. 20.2). As linhas M e Z são, com efeito, plataformas para a ancoragem dos filamentos de miosina e actina. No músculo estriado, o aumento da intercalação de filamentos espessos e finos durante a contração causa o encolhimento da zona H (apenas miosina) e das bandas I (apenas actina). No músculo liso, os filamentos espessos e finos são ancorados em estruturas chamadas corpos densos, que são adicionalmente ancoradas por filamentos intermediários. Embora os três tipos musculares contenham as mesmas proteínas, cada tipo muscular expressa isoformas específicas do tecido; a actina e a troponina cardíacas, por exemplo, diferem ligeiramente das do músculo esquelético.



Quadro clínico

Distrofias musculares

Um menino foi levado a uma clínica porque sua mãe observou que ele andava com uma marcha de pato (ou marcha anserina). A avaliação física confirmou fraqueza muscular, especialmente nas pernas, embora seus músculos da panturrilha estivessem grandes e firmes. Havia uma elevação de 20 vezes na atividade sérica de creatina (fosfo)cinase (CK), identificada como isoenzima MM (músculo). A histologia revelou perda muscular, alguma necrose e aumentos do tecido conjuntivo e volume de gordura no músculo. Uma hipótese de diagnóstico de distrofia muscular de Duchenne (DMD) foi confirmada por análise imunoeletroforética *(Western blot)*, mostrando a falta de distrofina, proteína do citoesqueleto, no músculo.

Comentário

Embora existam muitas formas de distrofia muscular, algumas genéticas e outras adquiridas, a DMD é a distrofia genética mais comum e é letal. A **distrofina** é uma proteína de elevado peso molecular do citoesqueleto que reforça a membrana plasmática da célula muscular e medeia interações com a matriz extracelular. Em sua ausência, a membrana plasmática das células musculares é danificada durante o processo contrátil, levando à morte das células musculares.

O gene da distrofina está localizado no cromossomo X e possui um comprimento de aproximadamente $2{,}5 \times 10^6$ pares de bases. Mutações espontâneas neste gene são relativamente comuns, sendo a frequência da DMD de aproximadamente 1 em 3.500 nascimentos do sexo masculino. A DMD é uma doença miodegenerativa progressiva, geralmente levando ao confinamento à cadeira de rodas pela puberdade, com morte em torno dos 30 anos por insuficiência respiratória ou cardíaca. A distrofina está completamente ausente em pacientes com DMD, embora uma variante da doença,

conhecida como distrofia muscular de Becker, tenha sintomas mais tênues e seja caracterizada pela expressão de uma proteína distrofina alterada, com expectativa de sobrevivência até a quinta década. Embora a DMD não tenha atualmente tratamento, a terapia gênica é promissora, e novas tecnologias que utilizam o "salto de éxons" permitem que as células saltem éxons mutados e, dessa forma, traduzam um produto proteico ligeiramente menor, mas ainda assim funcional. A proteína distrofina menor produz sintomas do tipo Becker em experimentos animais e, como tal, pode traduzir-se em uma duplicação do tempo de vida humano se os resultados forem reprodutíveis em seres humanos.

Proteínas do sarcômero

Miosina

A interação entre a actina e a miosina durante a contração muscular é dependente da concentração citoplasmática de Ca^{2+}

A miosina é uma das maiores proteínas do organismo, com uma massa molecular de aproximadamente 500 kDa, representando mais de metade da proteína muscular (Tabela 20.2). No microscópio eletrônico, a miosina surge como uma proteína alongada com duas cabeças globulares. É o componente primário dos filamentos espessos no músculo. Cada molécula de miosina é constituída por duas cadeias pesadas (aproximadamente 200 kDa) e quatro cadeias leves (aproximadamente 20 kDa). A cadeia pesada pode ser subdividida na cauda helicoidal e nas regiões globulares da cabeça; as quatro cadeias leves estão ligadas às cabeças globulares. A análise estrutural por proteólise limitada indica que existem duas regiões flexíveis de dobradiça na molécula de miosina (Fig. 20.3): uma onde a cabeça globular se liga à região helicoidal e outra, adicional, dentro da região helicoidal. Os filamentos de miosina estão associados através de suas regiões helicoidais e se estendem para fora a partir da linha M em direção à linha Z de cada miofibrila (Figs. 20.2 e 20.3). As regiões em dobradiça permitem que as cabeças de miosina interatuem com a actina e conferem a flexibilidade necessária às interações reversíveis e alterações conformacionais durante a contração muscular.

Tabela 20.2

Proteínas musculares e suas funções

Proteína	Função
Miosina	atividade de ATPase dependente de Ca^{2+}
Proteína-C	reunião de miosina em filamentos espessos
Proteína-M	ligação de filamentos de miosina à linha M
Actina	actina G se polimeriza em actina F filamentosa
Tropomiosina	estabilização e propagação de alterações conformacionais da actina F
Troponinas-C, -I e -T	modulação das interações actina-miosina
Actininas-α e -β	estabilização da actina F e ancoragem à linha Z
Nebulina	possível papel na determinação do comprimento dos filamentos de actina F
Titina	controle da tensão de repouso e comprimento do sarcômero
Desmina	organização das miofibrilas nas células musculares
Distrofina	reforço do citoesqueleto e da membrana plasmática da célula muscular

A actina e a miosina representam mais de 90% das proteínas musculares, mas várias proteínas associadas são necessárias para a estruturação e função do complexo actomiosina.

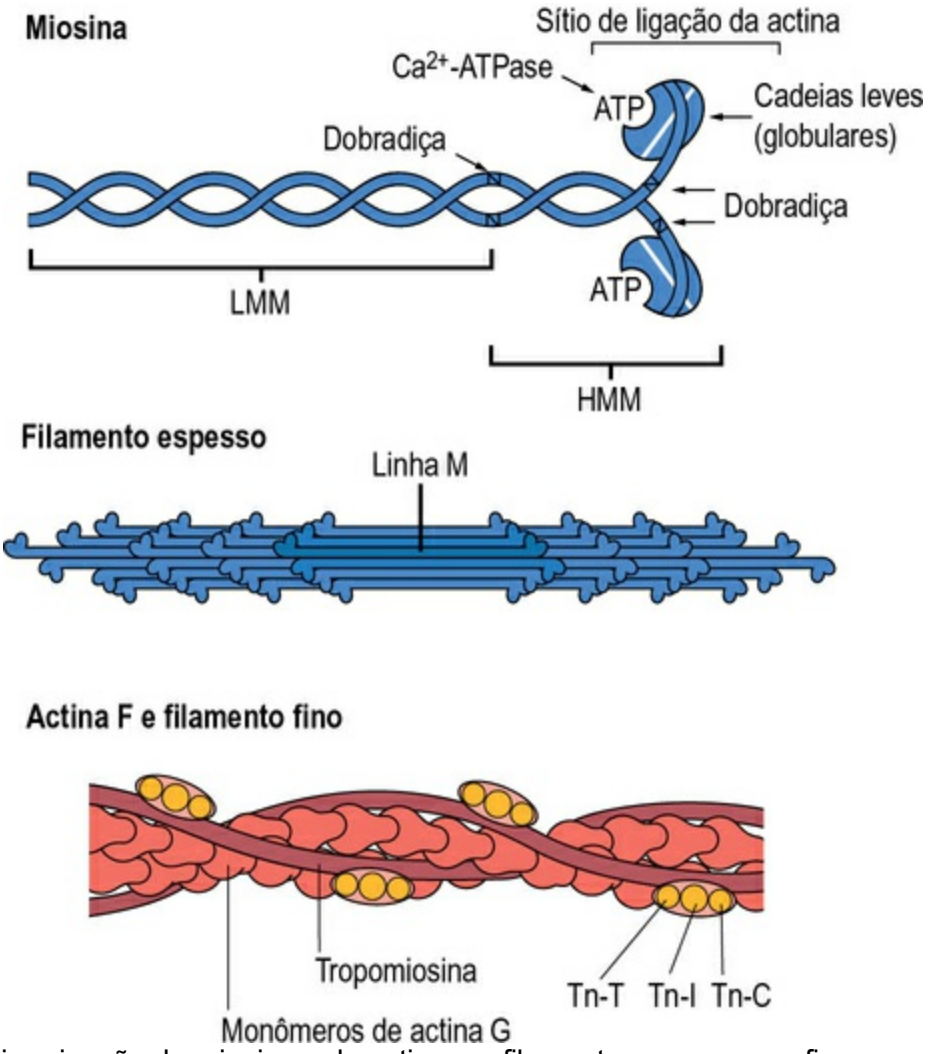


FIG. 20.3 Polimerização da miosina e da actina em filamentos espessos e finos.
Tn-C, troponina ligante de cálcio; Tn-I, subunidade inibitória da troponina; Tn-T, troponina ligante de tropomiosina; LMM, meromiosina leve; HMM, meromiosina pesada.

Há várias características da miosina que são essenciais para a contração muscular.

- As cabeças globulares da miosina possuem sítios de ligação para o ATP e os produtos de sua hidrólise, ADP e fosfato (Pi).
- As cabeças globulares da miosina possuem uma atividade ATPase dependente de Ca^{2+}.
- A miosina se liga reversivelmente à actina em função das concentrações de Ca^{2+}, ATP e ADP + Pi.
- A ligação de cálcio e a hidrólise de ATP conduzem a grandes alterações na conformação da molécula de miosina e em sua interação com a actina.
- A atividade **miosina-ATPase,** as interações miosina-actina e as alterações conformacionais estão integradas no modelo do deslizamento de filamentos da contração muscular (a seguir). Elas também explicam o desenvolvimento de *rigor mortis*. O aumento de Ca^{2+} no citoplasma muscular (sarcoplasma) e a diminuição de ATP após a morte levam a uma forte ligação entre a miosina e a actina, formando o tecido muscular rígido.

Actina

A actina é composta por subunidades de 42 kDa, conhecidas como **actina G** (globular),

que polimerizam em um arranjo filamentoso **(actina F).** Duas cadeias poliméricas enrolam uma em torno da outra para formar o miofilamento de actina F (Fig. 20.3). A actina F é o componente principal do filamento fino e interatua com a miosina no complexo de actomiosina. As cadeias de actina F se estendem em direções opostas a partir da linha Z, sobrepondo-se às cadeias de miosina que se estendem a partir da linha M. Cada filamento espesso contendo miosina é rodeado por seis moléculas de actina contendo filamentos finos. Cada filamento fino interatua com três filamentos espessos contendo miosina (Fig. 20.1 para uma visão em seção transversa).

Tropomiosina e troponinas

As troponinas modulam a interação entre a actina e a miosina

A ativação da contração muscular por cálcio no músculo estriado envolve as proteínas associadas a filamentos finos, tropomiosina e troponinas. A **tropomiosina** é uma proteína fibrosa que se estende ao longo das fendas da actina F, cada molécula contactando com cerca de sete subunidades de actina G. A tropomiosina tem um papel na estabilização da actina F e na coordenação de alterações conformacionais entre as subunidades de actina durante a contração. Na ausência de Ca^{2+}, a tropomiosina bloqueia o sítio de ligação da miosina na actina.

Um complexo de proteínas **troponinas** se encontra ligado à tropomiosina: Tn-T (ligante de tropomiosina), Tn-C (ligante de cálcio) e Tn-I (subunidade inibitória). A ligação de cálcio à Tn-C, uma proteína similar à calmodulina, induz mudanças na Tn-I, que alteram a interação entre a tropomiosina e a actina, expondo o sítio de ligação da miosina na actina F e possibilitando interações actina-miosina. Para uma descrição do uso diagnóstico das medições de troponina cardíaca, consulte o Quadro no final deste capítulo.

Titina

A titina modula a tensão passiva do músculo

A titina é a maior proteína do corpo humano, com mais de 34.000 aminoácidos e uma massa de 3.800 kDa. Estruturalmente, a titina ocupa metade do comprimento do sarcômero, com seu *N*-terminal ancorado à linha Z, e seu *C*-terminal ao filamento espesso na linha M. A titina tem um **domínio PEVK** elástico e extensível (rico em Pro, Glu, Val e Lys) que contribui para a tensão muscular miocárdica e esquelética passiva, e um domínio cinase que participa na sinalização intracelular. Dependendo do músculo esquelético, a titina pode representar mais de metade da tensão passiva do músculo, e contribui com uma propriedade do tipo mola para o sarcômero — quando um músculo é distendido, é armazenada energia potencial no domínio PEVK, que volta a se enrolar durante o relaxamento. Mutações em uma região da titina podem causar uma doença genética cardíaca (p. ex., cardiomiopatia hipertrófica), enquanto uma mutação em outro local do gene causa uma doença somente do músculo esquelético (p. ex., distrofia muscular do tipo cinturas).

O processo de contração

O modelo do deslizamento de filamentos da contração muscular

O modelo do deslizamento de filamentos descreve como uma série de alterações químicas e estruturais no complexo de actomiosina pode induzir o encurtamento dos sarcômeros

A resposta contrátil depende da formação reversível, dependente de Ca^{2+}, de **pontes cruzadas** entre a cabeça de miosina e seu sítio de ligação na actina. Uma mudança conformacional nas regiões de dobradiça da miosina ocorre após a formação de pontes cruzadas, fornecendo o **golpe de força** para a contração muscular (Fig. 20.4). Essa alteração conformacional, o relaxamento de uma forma de alta energia da miosina, é acompanhada de dissociação de ADP e Pi. Uma vez terminado o golpe, a ligação e a hidrólise de ATP repõem a conformação de alta energia. A estabilidade do estado contraído é mantida por múltiplas e contínuas interações actina-miosina dependentes de Ca^{2+}, pelo que o deslizamento é minimizado até que o cálcio seja removido do sarcoplasma, permitindo a dissociação do complexo actomiosina e o relaxamento muscular.

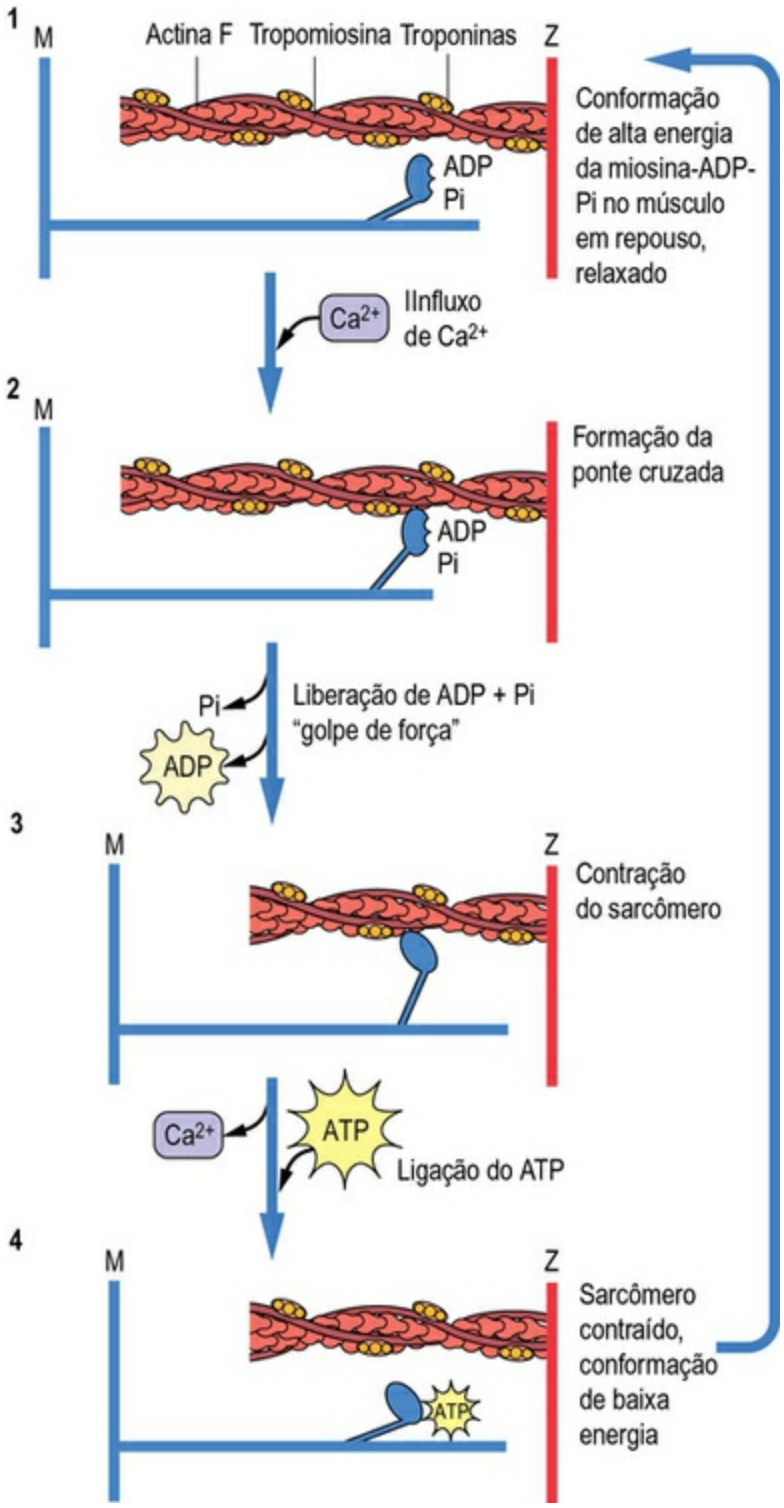


FIG. 20.4 Estágios propostos na contração muscular, de acordo com o modelo de deslizamento de filamentos.

(1) No músculo em repouso, relaxado, a concentração de cálcio é de cerca de 10^7 mol/L. O grupo da cabeça das cadeias de miosina contém ADP e Pi ligados, e se estende a partir do eixo da hélice de miosina em uma conformação de alta energia. Embora o complexo miosina-ADP-Pi tenha alta afinidade pela actina, a ligação da miosina à actina é impedida pela tropomiosina, que bloqueia o sítio de ligação à miosina na actina em baixas concentrações de cálcio. (2) Quando o músculo é estimulado, o cálcio entra no sarcoplasma através de canais de cálcio controlados por voltagem (Cap. 8). A ligação de cálcio à Tn-C causa uma alteração conformacional na Tn-I, que é transmitida através da Tn-T à tropomiosina. O movimento da tropomiosina expõe o sítio de ligação à miosina na actina. A miosina-ADP-Pi se liga à actina, formando uma ponte. (3) A liberação do Pi, e depois do ADP, da miosina durante a interação com a actina é acompanhada de uma grande alteração conformacional na miosina, produzindo o "golpe de força" que move a cadeia de actina em cerca de 10 nm (100 Å) no sentido oposto à cadeia de miosina, aumentando sua sobreposição e causando a contração muscular. (4) A captação de cálcio do sarcoplasma e a ligação do ATP à miosina leva à

dissociação da ponte de actomiosina. O ATP é hidrolisado, sendo a energia livre desta hidrólise conservada como conformação de alta energia da miosina, criando condições para a contração muscular contínua em resposta ao pico seguinte de concentração de Ca^{2+} no sarcoplasma.



Quadro clínico

Perda muscular durante a sepse

O músculo esquelético afeta tanto a morbidade quanto a mortalidade da sepse. A sepse é a principal causa de morte nas unidades de cuidados intensivos (UCI) não coronários e a décima causa de morte nos Estados Unidos como um todo. A incidência de sepse grave nos Estados Unidos é de aproximadamente 700.000 casos por ano, e vem aumentando 8% a cada ano. Inúmeros fatores estão contribuindo para esse aumento (p. ex., aumento da idade da população, uso excessivo de antibióticos). A sepse pode ser definida como uma regulação inapropriada da resposta imune e fisiológica a um patógeno. Normalmente, o organismo responde a uma infecção erradicando o patógeno quando ele entra em contato com as células imunes. Quando esse sistema se encontra sobrecarregado, perturba toda a homeostasia do organismo e resulta frequentemente em falência multiorgânica.

De fato, a taxa de mortalidade das formas mais graves de sepse é >50%. Enquanto o controle da resposta inflamatória e erradicação do patógeno são os objetivos terapêuticos primários, o músculo esquelético desempenha um papel importante no prognóstico do paciente. A sepse resulta em perdas de massa muscular graves, e os pacientes com pouca massa muscular são mais suscetíveis a morrer de sepse. A via de degradação do músculo é ativada por citocinas inflamatórias, como a IL-6 e o TNF-α, causadas pela resposta imune incontrolada. A degradação de proteína muscular e a liberação de aminoácidos no sangue são semelhantes aos da inanição. No entanto, estão envolvidas vias moleculares diferentes; o aumento da ingestão de alimentos ou proteínas não é tão eficiente, já que as vias de sinalização anabólicas não respondem. Uma vez que a perda muscular é um fator que contribui para a morbidade e mortalidade de pacientes e afeta os resultados de recuperação a longo prazo, os métodos para atenuar a perda muscular associada à sepse se tornam de importância primordial. Existem várias vias de degradação proteica relacionadas com perda muscular, mas a via da ubiquitina-proteassoma (UbP) (ver Cap. 34 para mais detalhe) parece a via primária ativada durante a sepse. As proteínas miofibrilares são mais suscetíveis, e a 3-metil-histidina, um aminoácido modificado pós- -tradução encontrado na actina e na miosina, aumenta no sangue e na urina em resultado da renovação proteica. A via UbP é atualmente um alvo de fármacos em desenvolvimento que poderão ser usados especificamente para tratar a perda muscular durante a sepse e, como tal, melhorar as taxas de mortalidade.

Uma maior atividade miosina-ATPase aumenta os ciclos de formação de pontes

cruzadas, o que possibilita uma maior velocidade de contração. Diferentes isoformas de miosina possuem níveis variáveis de atividade ATPase, sendo que os músculos rápidos têm maiores taxas de atividade miosina-ATPase. São também encontradas isoformas de actina e miosina no citoesqueleto de células não musculares, onde desempenham papéis em diversos processos, como a migração celular, o transporte de vesículas durante a endocitose e a exocitose, manutenção ou alteração da forma celular e ancoragem de proteínas intracelulares à membrana plasmática.

Acoplamento excitação-contração: despolarização da membrana

Os túbulos T transmitem sinais eletroquímicos para uma eficiente contração muscular

A contração do músculo esquelético é iniciada por estimulação neuronal na placa terminal motora neuromuscular. Como descrito anteriormente (Fig. 8.4), esse estímulo leva à despolarização do gradiente eletroquímico através da membrana plasmática muscular (sarcolema). A despolarização, causada por um influxo de Na^+, se propaga rapidamente ao longo da **membrana do sarcolema** e sinaliza uma liberação de cálcio controlada por voltagem a partir do **retículo sarcoplasmático** (RS), um compartimento ligado à membrana e sequestrador de cálcio no interior da célula muscular. O influxo de Ca^{2+} do RS para o sarcoplasma inicia a formação de pontes cruzadas e o acoplamento excitação-contração (Fig. 20.4). No músculo estriado, a despolarização é transmitida à fibra muscular por invaginações da membrana plasmática, chamadas de **túbulos transversos (túbulos T)** (Fig. 20.5). A transmissão de despolarização através da altamente ramificada rede de túbulos T, em íntima interação com o RS, conduz à liberação rápida e concertada de cálcio do RS para o sarcoplasma. De forma que a despolarização ocorra novamente, o sódio deve ser bombeado ativamente para fora do citosol por bombas Na^+/K^+-ATPases, localizadas no sarcolema. A velocidade de repolarização muscular é afetada tanto pela velocidade quanto pela densidade dessas bombas. São encontrados maiores níveis de atividade Na^+/K^+-ATPase em músculos de contração rápida, e uma densidade aumentada de bombas Na^+/K^+-ATPases é uma importante adaptação ao exercício.

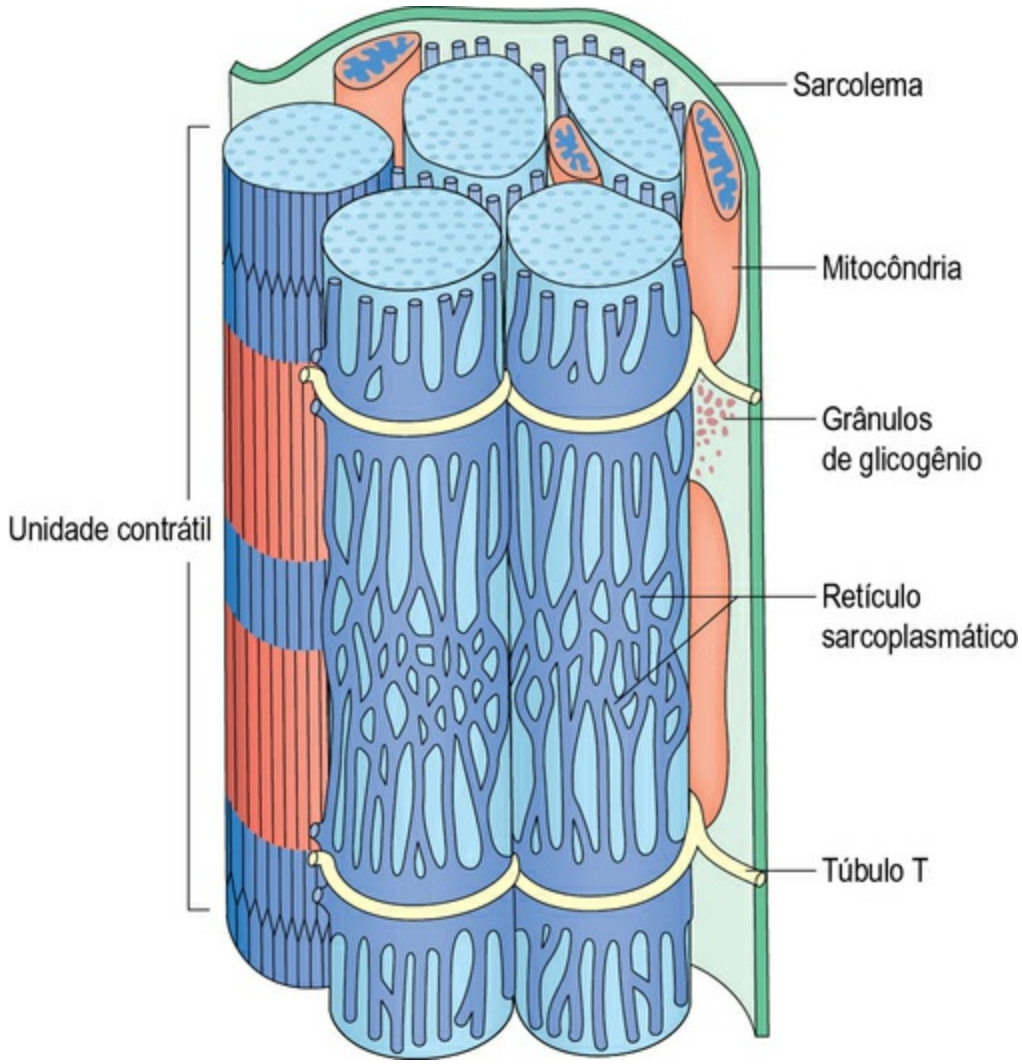


FIG. 20.5 Vista lateral da rede tubular transversa nas células do músculo esquelético. Os túbulos transversos são invaginações do sarcolema, que estão ligadas ao retículo sarcoplasmático (RS) por canais proteicos. O RS é um compartimento tubular contínuo em estreita associação com as miofibrilas. Os túbulos transversos são extensões do sarcolema em torno da linha Z. Eles transmitem o impulso nervoso despolarizante para as regiões terminais do RS, coordenando a liberação de cálcio e a contração da miofibrila.

Os músculos esquelético, cardíaco e liso diferem em seu mecanismo de estimulação neural e possuem diferentes adaptações estruturais para a propagação da despolarização. A contração do músculo esquelético é voluntária, e as fibras são inervadas por placas terminais de nervos motores que se originam na medula espinhal; a acetilcolina funciona como neurotransmissor (Cap. 41). A **junção neuromuscular** é uma característica estrutural especial do músculo esquelético que não se encontra no músculo cardíaco ou liso. Cada fibra individual é inervada por um único nervo motor, e todas as fibras inervadas por um nervo são definidas como uma **unidade motora.** O controle e a sincronização da unidade motora são a base para a contração coordenada de um músculo como um todo. As caîmbras do músculo esquelético são uma contração muscular involuntária resultante de alterações no controle neuromuscular e/ou de desequilíbrios eletrolíticos após a perda excessiva de fluidos, tipicamente durante o exercício intenso em condições de calor e umidade.

O músculo cardíaco é estriado e se contrai ritmicamente sob controle involuntário. O mecanismo geral de contração do músculo cardíaco é similar ao do músculo esquelético;

porém, o retículo sarcoplasmático é menos desenvolvido, e a rede de túbulos transversos é mais desenvolvida no coração. O coração é mais dependente e, na verdade, requer cálcio extracelular para sua resposta contrátil (Fig. 8.4); o influxo de cálcio extracelular acentua a liberação de Ca^{2+} do RS. Desprovidos de um contato neural direto, os miócitos cardíacos propagam a despolarização a partir de um nódulo isolado, o nódulo sinoatrial (nódulo SA), através de todo o miocárdio. A despolarização passa de célula a célula por estruturas membranares especializadas chamadas **discos intercalados.** O músculo cardíaco é também mais responsivo à regulação hormonal. Por exemplo, as proteínas cinases dependentes de cAMP fosforilam proteínas de transporte e a Tn-I, mediando alterações na força de contração em resposta à epinefrina.

O músculo liso pode responder tanto a fatores neurais quanto a fatores circulantes. Ao contrário do músculo esquelético, a chegada neural para o músculo liso inerva feixes de células musculares lisas que causam contrações tanto fásicas (rítmicas) quanto tônicas (sustentadas) do tecido. O músculo liso pode, também, ser induzido a despolarizar por interações ligante-receptor no sarcolema. Isso é chamado de acoplamento fármaco-mecânico e é a base para muitos fármacos direcionados para a contração ou relaxamento do músculo liso. Os **doadores de óxido nítrico,** como os nitritos de amila e a nitroglicerina, usados no tratamento da angina, relaxam os músculos lisos vasculares, aumentando o fluxo de sangue para o músculo cardíaco.

Acoplamento excitação-contração: o gatilho de cálcio

O conteúdo de cálcio do sarcoplasma é normalmente muito baixo, 10^{-7} mol/L ou menos, mas aumenta rapidamente em mais de cem vezes em resposta à estimulação neural. O retículo sarcoplasmático, uma organela especializada derivada do retículo endoplasmático liso, é rico em uma proteína ligante de Ca^{2+}, a **calsequestrina,** e serve como local de sequestro de cálcio no interior da célula. Em músculos estriados, a despolarização dos túbulos T abre os canais de Ca^{2+} no RS (Fig. 20.5). **O influxo de Ca^{2+} para o sarcoplasma despoleta tanto as interações actina-miosina quanto a atividade de miosina-ATPase, levando à contração muscular.** As troponinas não são expressas no músculo liso. Nesse caso, o cálcio aciona a contração por ligação à calmodulina e ativação da cinase de cadeia leve da miosina, que então fosforila a miosina. A fosforilação da miosina aumenta a interação miosina-actina.

O aumento de cálcio intracelular ativa mais pontes cruzadas e causa o encurtamento do sarcômero através da ativação da miosina-ATPase. Assim, níveis crescentes de cálcio aumentam a força contrátil do músculo, até que seja atingida a saturação. Os bloqueadores de canais de cálcio empregados no tratamento da **hipertensão,** tais como a nifedipina, inibem o fluxo de Ca^{2+} para o interior do RS, consequentemente limitando a força de contração dos miócitos cardíacos. Enquanto a contração muscular é desencadeada pelo aumento do cálcio, o relaxamento muscular depende de o cálcio ser ativamente bombeado de volta para o RS. A velocidade de relaxamento muscular está diretamente relacionada com a atividade Ca^{2+}-ATPase do RS. O RS é rico em Ca^{2+}-ATPase, que mantém o cálcio citosólico no sarcoplasma em concentrações submicromolares

(~10^{-7} mol/L). À medida que os níveis de cálcio intracelulares decrescem, o número de pontes cruzadas ativas também diminui, e a força de contração muscular declina.



Quadro clínico

Hipertermia maligna

Cerca de 1 em cada 150.000 pacientes submetidos à anestesia com halotano (halocarbono gasoso) ou tratados com relaxantes musculares responde com rigidez muscular esquelética excessiva e hipertermia grave, com início rápido, até 2°C (4°F) em uma hora.

Caso o tratamento não seja rápido, as anormalidades cardíacas podem ser fatais; a mortalidade nessa condição excede os 10%. Esta doença genética resulta da liberação excessiva ou prolongada de Ca^{2+} do RS, mais comumente resultado de mutações em gene(s) que codifica(m) proteínas dos canais de liberação de Ca^{2+} do RS. A liberação excessiva de Ca^{2+} leva a um aumento prolongado da concentração sarcoplasmática de Ca^{2+}. A rigidez muscular resulta do consumo de ATP dependente de $Ca^{2+,}$ e a hipertermia resulta do aumento do metabolismo para repor o ATP.

À medida que o metabolismo muscular se torna anaeróbico, a lactiacidemia e a acidose podem desenvolver-se. As anormalidades cardíacas resultam da hipercalemia, causada pela liberação de íons potássio do músculo; como as reservas de ATP estão esgotadas, as células musculares são incapazes de manter os gradientes iônicos através de suas membranas plasmáticas. O tratamento da hipertermia maligna inclui o uso de relaxantes musculares, como, por exemplo, o dantrolene, um inibidor dos canais de Ca^{2+} sensíveis à rianodina, para inibir a liberação de Ca^{2+} do RS. A terapia de suporte envolve resfriamento, administração de oxigênio, correção do pH sanguíneo e dos desequilíbrios eletrolíticos e também o tratamento das anormalidades cardíacas.

Metabolismo energético do músculo

Recursos energéticos na célula muscular

O músculo é o local primário de **deposição de glicose** (captação da circulação) no organismo e, portanto, é um alvo natural do tratamento da hiperglicemia no diabetes. O transportador de glicose GLUT-4 é transportado para a superfície celular não só em resposta à insulina ou fármacos, mas também em reposta ao estado energético da célula e devido a contrações musculares. Assim, o exercício funciona como um regulador dos níveis sanguíneos de glicose e, com efeito, como tratamento para o diabetes — o exercício, neste contexto, é um bom remédio. O conteúdo e atividade muscular da hexocinase também aumentam com o exercício, tanto de forma aguda (~3 horas após uma sessão) quanto de forma crônica (após várias semanas de treino). Estudos em modelos animais demonstraram que o exercício e os fármacos ativam cascatas de sinalização bioquímica tanto similares quanto distintas no músculo; dessa forma, os dois

tratamentos parecem complementares.

O ATP é usado para a contração muscular

Três ATPases são necessárias à contração muscular: a Na^+/K^+-ATPase, a Ca^{2+}-ATPase e a miosina-ATPase. Uma disponibilidade reduzida de ATP ou a inibição de qualquer uma dessas ATPases causará um decréscimo na produção de força muscular. Contudo, a concentração intracelular de ATP não se altera consideravelmente durante o exercício. O músculo em contração ativa depende da rápida ressíntese de ATP a partir de ADP. Os sistemas energéticos que sintetizam ATP para a contração muscular incluem a lançadeira do fosfato de creatina, a glicólise anaeróbica a partir da glicose plasmática ou glicogênio, e o metabolismo aeróbico da glicólise e de ácidos graxos através da fosforilação oxidativa. Os sistemas energéticos que sintetizam ATP não são equivalentes e afetam diretamente a quantidade e duração da potência gerada pelo músculo em contração.

Contrações de curta duração e alta potência

O fosfato de creatina funciona como um tampão de fosfatos de alta energia usado para a regeneração rápida de ATP no músculo

Uma realidade metabólica para o músculo esquelético é que a produção de uma elevada força pode apenas ser mantida por um curto período de tempo. As contrações iguais ou próximas dos níveis de potência máximos dependem da elevada atividade miosina-ATPase e da rápida ressíntese de ATP por fosforilação em nível de substrato, usando o composto de alta energia fosfato de creatina (creatina-P). A creatina (Tabela 9.2) é sintetizada a partir da arginina e da glicina e é reversivelmente fosforilada a creatina-P pela enzima **creatina (fosfo)cinase (CK ou CPK)** (Fig. 20.6). A CK é uma proteína dimérica e existe sob a forma de três isoenzimas: as isoformas MM (músculo esquelético), BB (cérebro) e MB. A isoforma MB se encontra enriquecida no músculo cardíaco.

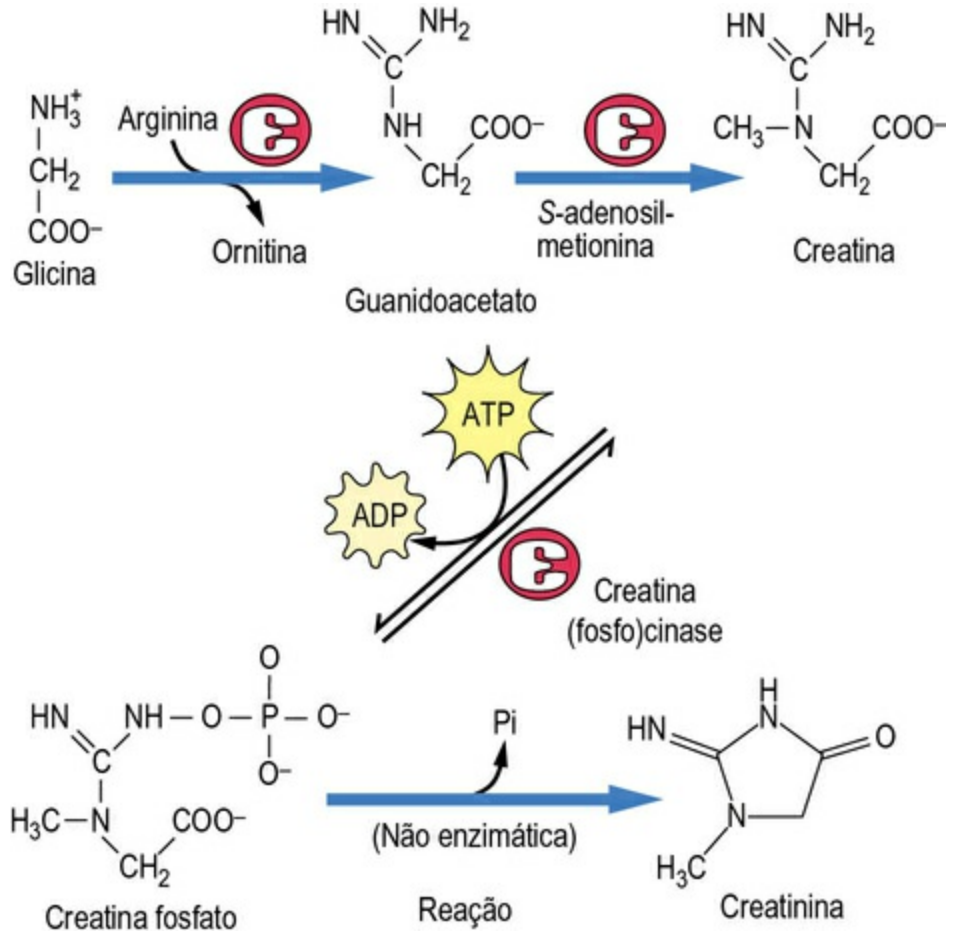


FIG. 20.6 Síntese e degradação do fosfato de creatina (creatina-P). A creatina é sintetizada a partir dos precursores glicina e arginina. A creatina-P é instável e sofre degradação lenta e espontânea em Pi e creatinina, a forma anidrido cíclica da creatina, que é excretada pela célula muscular para o plasma, e deste para a urina.

O nível de creatina-P no músculo em repouso é muito mais elevado do que o de ATP (Tabela 20.3). Assim, a concentração de ATP permanece relativamente constante durante as fases iniciais do exercício. É reposta não só pela ação da CK, mas também pela adenilato cinase **(miocinase),** de acordo com o seguinte:

Tabela 20.3

Alterações nos recursos energéticos no músculo em trabalho: concentrações de metabólitos energéticos no músculo da perna humana durante exercício em bicicleta

Metabólito	Concentração de metabólito (mmol/kg de peso seco)		
	Em repouso	3 minutos	8 minutos
ATP	27	26	19
Creatina-P	78	27	7
Creatina	37	88	115
Lactato	5	8	13
Glicogênio	408	350	282

Estes experimentos foram conduzidos durante o exercício isquêmico, o qual exacerba o declínio na concentração de ATP. Eles ilustram o declínio rápido da creatina-P e o aumento do lactato derivado da glicólise anaeróbica do glicogênio muscular.

Dados adaptados de Timmons JA, et al.: J Clin Invest 101:79-85, 1998.

$$\text{Creatina (Cr) fosfocinase} : \text{Cr} - \text{P} + \text{ADP} \rightarrow \text{Cr} + \text{ADP}$$

$$\text{Adenilato cinase} : 2\,\text{ADP} \rightleftharpoons \text{ATP} + \text{AMP}$$

As reservas de fosfato de creatina declinam rapidamente durante o primeiro minuto de contração muscular de alta potência. À medida que as reservas de fosfato de creatina se esgotam, o músculo torna-se incapaz de sustentar a geração de força elevada, e a força contrátil diminui rapidamente. Nesse ponto, a glicogenólise muscular se torna a principal fonte de energia. A entrada de cálcio no músculo, além de seu papel na ativação da contração dependente de miosina-ATPase, também conduz à formação de um complexo Ca^{2+}-calmodulina, que ativa a fosforilase cinase, catalisando a conversão da fosforilase *b* em fosforilase *a*. O AMP também ativa alostericamente a fosforilase muscular e a fosfo-frutocinase-1, acelerando a glicólise a partir do glicogênio muscular (Cap. 13).

Um declínio adicional na força ocorre à medida que o piruvato e o lactato se acumulam gradualmente no músculo em contração, resultando em um decréscimo no pH muscular. A força irá então diminuir para um nível que pode ser mantido pelo metabolismo aeróbico de ácidos graxos. A potência aeróbica máxima é de cerca de 20% da geração de potência máxima possível, e cerca de 50-60% da potência aeróbica máxima podem ser sustentados por longos períodos de tempo.

Contrações de baixa intensidade e longa duração

Os ácidos graxos são a principal fonte de energia no músculo durante o exercício prolongado

A disponibilidade e a utilização de oxigênio no trabalho muscular são importantes limitações à manutenção da atividade física contínua. A atividade contrátil de longa duração requer adequada entrega de oxigênio e a capacidade de o músculo utilizar o oxigênio liberado. A entrega de oxigênio para o músculo é afetada pelas concentrações de eritrócitos e de hemoglobina no sangue, pelo número de capilares no músculo e pela capacidade de bombeamento cardíaca. O músculo altamente oxidativo tem uma maior densidade capilar do que o músculo glicolítico, e a densidade capilar do músculo aumenta com o treinamento através de exercícios de resistência. A utilização muscular de oxigênio é também diretamente relacionada com o número e tamanho das mitocôndrias musculares. Os músculos sujeitos a atividade contrátil contínua, como os músculos posturais, possuem mais mitocôndrias do que o músculo contraído com pouca frequência. Uma observação comum ao músculo sujeito a demandas contráteis aumentadas é uma elevação na atividade de enzimas oxidativas.

Em repouso ou em baixas intensidades de trabalho físico, o oxigênio está prontamente disponível e a oxidação aeróbica de lipídios predomina enquanto fonte principal de síntese de ATP. Contudo, em intensidades de trabalho mais elevadas, a disponibilidade de oxigênio para o catabolismo lipídico pode se tornar limitativa e, subsequentemente, a velocidade de trabalho do músculo diminui. Durante os primeiros 15-30 minutos de exercício, existe uma transição gradual da glicogenólise e da glicólise para o metabolismo aeróbico de ácidos graxos. Talvez esta seja uma resposta evolutiva para lidar com o fato de o lactato, produzido pela glicólise, ser mais ácido e menos difusível do que o CO_2. À medida que o exercício continua, a epinefrina contribui para a ativação da gliconeogênese hepática, fornecendo uma fonte exógena de glicose para o músculo. Os lipídios se tornam gradualmente a fonte principal de energia no músculo durante o exercício de longa duração e de menor intensidade, quando o oxigênio não é limitativo.

O desempenho muscular de longa duração (resistência) depende dos níveis de glicogênio muscular

As gorduras se queimam na chama dos carboidratos; o glicogênio é necessário ao metabolismo eficiente dos lipídios no músculo

Metaforicamente, os corredores de maratona "batem na parede" quando o glicogênio muscular atinge um nível criticamente baixo. O glicogênio é a forma de reserva de glicose no músculo esquelético e sua concentração muscular pode ser manipulada pela dieta, como, por exemplo, pelo **consumo de carboidratos** antes de uma corrida de maratona. A fadiga, que pode ser definida como uma incapacidade de manter a produção de força desejada, ocorre quando a velocidade de utilização de ATP excede a sua velocidade de síntese. Para uma síntese eficiente de ATP, há uma exigência contínua — mas pouco compreendida — de um nível basal de metabolismo de glicogênio, mesmo quando a glicose está disponível a partir do plasma e quando as gorduras são as fontes primárias

de energia muscular. O metabolismo de carboidratos é importante como fonte de piruvato, que é convertido em oxaloacetato pela reação anaplerótica da piruvato carboxilase. O oxaloacetato é necessário à manutenção da atividade do ciclo do ácido cítrico (TCA), para a condensação com a acetil-CoA derivada das gorduras. Até certo ponto, o glicogênio muscular pode ser poupado, e o tempo de desempenho pode ser aumentado durante a atividade física vigorosa de longa duração, pelo aumento da disponibilidade de glicose circulante, tanto pela gliconeogênese quanto pela ingestão de carboidratos, como, por exemplo, pão ou Gatorade®. A utilização aumentada de ácidos graxos durante os estágios iniciais do exercício é uma importante adaptação de treinamento à atividade física vigorosa regular — serve para poupar as reservas de glicogênio.

O músculo consiste em dois tipos de células musculares estriadas: fibras rápidas glicolíticas e fibras lentas oxidativas

As células do músculo estriado são geralmente classificadas por suas propriedades contráteis fisiológicas (rápidas *versus* lentas) e tipo predominante de metabolismo (oxidativo *versus* glicolítico). O tipo de músculo está estreitamente relacionado com a função muscular no músculo esquelético, e essa comparação pode ser facilmente vista em músculos cuja contração seja de movimentos pouco frequentes de explosão *versus* músculos utilizados continuamente para a manutenção da postura (antigravidade). A coloração dos dois tipos de músculo estriado os distingue rapidamente. O **músculo rápido glicolítico,** usado em atividades de explosão, é de aparência branca (como o peito de galinha — as galinhas cacarejam muito, mas não podem voar longe!), devido a um menor fluxo sanguíneo, menor densidade de mitocôndrias e reduzido conteúdo em mioglobina, comparado com o músculo de contração lenta oxidativo, que é vermelho. As fibras rápidas glicolíticas também têm reservas aumentadas de glicogênio e menor conteúdo de gordura: elas dependem do glicogênio e da glicólise anaeróbica para explosões curtas de contração quando é requerida força muscular adicional, como nas respostas de estresse de "luta ou fuga". Estas fibras musculares não são capazes de manter a contração por períodos longos. Pelo contrário, as **fibras lentas oxidativas,** em músculos posturais (e em peito de ganso — os gansos são aves migratórias), são bem perfundidas por sangue, ricas em mitocôndrias e em mioglobina. Este tipo de músculo tem a capacidade de manter contrações de baixa intensidade por períodos longos. O músculo lento utiliza a oxidação de ácidos graxos para a síntese de ATP, o que requer mitocôndrias. O músculo cardíaco, que está em contração contínua, tem várias características contráteis e metabólicas que são similares às do músculo esquelético lento oxidativo. O músculo cardíaco é bem perfundido por sangue, rico em mitocôndrias e depende largamente do metabolismo oxidativo de ácidos graxos circulantes. O peito dos gansos, que suporta voos migratórios longos, é uma carne bastante gordurosa e escura, quando comparado com o peito de galinha, e tem muitas características do músculo

cardíaco.

Quadro de conceitos avançados

A sarcopenia

A sarcopenia, ou perda da massa muscular esquelética, se desenvolve gradualmente nos seres humanos após a quinta década de vida e pode levar à fragilidade e perda da capacidade funcional. Além da perda da qualidade de vida, a perda da massa muscular esquelética também aumenta o risco de mortalidade e morbidade. A causa da sarcopenia parece estar relacionada com decréscimos graduais da atividade física e perda da capacidade regenerativa. A inervação da fibra muscular pelos neurônios motores espinhais é crítica tanto para o desenvolvimento quanto para a manutenção das fibras (células) musculares. Os neurônios motores espinhais diminuem em número com o avanço da idade, possivelmente pelo dano oxidativo cumulativo a essas células pós-mitóticas. A diminuição do número de neurônios motores parece causar uma perda substancial (>40%) no número de fibras musculares, que é o determinante primário da **sarcopenia associada ao envelhecimento,** e é acompanhada pelo aumento no tamanho da unidade motora e pela diminuição da habilidade motora fina. A sarcopenia foi também relacionada com alterações sistêmicas induzidas pela idade nos sistemas endócrino, cardiovascular e imune, cujas funções são críticas para a manutenção da massa muscular esquelética.

Comentário

A evidência científica é clara em demonstrar que a maioria dos indivíduos idosos pode aumentar a força e a massa muscular com um programa regular de exercícios de resistência. Tratamentos com fármacos também têm sido examinados para indivíduos que não podem se exercitar regularmente. Atualmente não existe tratamento para a perda de neurônios motores espinhais. Os tratamentos com fármacos direcionados ao músculo exibiram graus variáveis de sucesso, mas estão geralmente limitados por efeitos colaterais. Os tratamentos incluem intervenções endócrinas com terapêutica de substituição hormonal com hormônios sexuais masculinos ou femininos e terapia com hormônio do crescimento. A medicação anti-inflamatória é também empregada para permitir aos indivíduos participar em programas de atividade física. Uma das melhores medidas preventivas contra a sarcopenia é o exercício regular para manter a massa muscular durante a meia-idade.

Quadro clínico

Síndromes de perda muscular

Muitos pacientes com acometimentos que incluem HIV e muitos cânceres sofrem uma grave perda de peso corporal, uma condição conhecida como **caquexia.** Os

pacientes com caquexia são frequentemente incapazes de tolerar radiação ou quimioterapia e têm maiores índices de morbidade e mortalidade. A perda de peso é geralmente independente da ingestão calórica e não está vinculada apenas ao jejum. Os estimulantes de apetite, isoladamente, são geralmente ineficazes. A perda de peso é associada à perda de tecido muscular e adiposo. Os problemas de saúde podem ser agravados em indivíduos com caquexia devido à desregulação metabólica que pode acompanhar a perda de tecido adiposo e muscular. Parece também haver um efeito do tipo de fibra na perda muscular, que pode estar associada ao metabolismo. Fibras musculares rápidas glicolíticas sofrem maior perda de proteína do que as fibras musculares lentas oxidativas. Essa perda preferencial de fibras rápidas glicolíticas com o desgaste se opõe ao que é observado em músculos submetidos a longos períodos de desuso (atrofia por desuso).

As fibras lentas oxidativas se atrofiam preferencialmente durante o desuso do músculo. Embora os mecanismos exatos indutores do desgaste não estejam definidos, os primeiros candidatos em várias síndromes consumptivas envolvem sinalização inflamatória sistêmica por citocinas, como o TNF-α e a IL-6. A sinalização inflamatória induzida pela evolução da doença ativa a degradação de proteínas musculares, inibe a síntese de proteínas musculares e induz a lipólise no tecido adiposo. A manutenção ou prevenção de perda grave de peso corporal em vários estados de doença pode melhorar as opções de tratamento, a sobrevivência e a qualidade de vida do paciente. Agentes anabolizantes, como a testosterona, têm comprovado benefício na manutenção de massa muscular em pacientes com AIDS e são de amplo uso clínico. Com outras doenças consumptivas, a investigação em modelos animais tem demonstrado que a inibição da sinalização inflamatória pode inibir a perda muscular. Estudos adicionais são necessários antes que essa abordagem seja largamente aplicada às populações humanas.

Quadro de teste clínico

Ensaio da creatina para avaliação da função renal e da diluição da urina

Uma vez que a concentração de fosfato de creatina é relativamente constante por unidade de massa muscular, a produção de creatinina (Fig. 20.6) é relativamente constante durante o dia. A creatinina é eliminada na urina em uma taxa relativamente constante por hora, primariamente por filtração glomerular e, em menor grau, por secreção tubular. Uma vez que sua concentração varia com a diluição da urina, níveis de metabólitos em amostras aleatórias de urina são muitas vezes normalizados para a concentração de creatinina urinária. Caso contrário, uma coleta de 24 horas seria necessária para avaliar a excreção diária de um metabólito. A concentração normal de creatinina no plasma é de cerca de 20-80 mmol/L (0,23-0,90 mg/dL). Aumentos na concentração de creatinina plasmática são comumente utilizados como um indicador de falha renal. A relação albumina/creatinina em uma amostra aleatória de urina, um

indicador da seletividade de filtração glomerular de proteínas, é usada como uma medida da microalbuminúria para avaliar a progressão da nefropatia diabética (Cap. 24).

Engenharia de tecidos e substituição do músculo

À medida que a engenharia de tecidos avança, o tecido muscular está na vanguarda dos experimentos para desenvolver um órgão fora do corpo humano. O músculo deriva de células em proliferação que se originam da camada germinativa mesenquimal no embrião em desenvolvimento. Essas células são "determinadas" para a linhagem muscular e se tornam mioblastos. Os **mioblastos** podem sair do ciclo celular e se diferenciar em células musculares multinucleadas maduras. As células do músculo esquelético (SkMC) são diferenciadas terminalmente, mas o músculo esquelético contém uma pequena população (<5% dos mionúcleos) de células precursoras musculares indiferenciadas, as células satélites. A proliferação e diferenciação das **células satélites** são eventos críticos para o crescimento e reparação musculares pós-natais, como, por exemplo, em resposta ao exercício e para a regeneração após lesão. O músculo esquelético é um dos poucos tecidos humanos que podem largamente se regenerar após dano extenso. O músculo é igualmente um candidato ideal para "substituição" de tecido após dano grave, já que se adapta rapidamente a seu ambiente mecânico e químico. Os músculos esqueléticos são altamente especializados quanto à sua localização e trabalho particular. As cirurgias de substituição muscular usando músculos de doadores para as mãos demonstraram que as diferenças morfológicas e bioquímicas devem ser consideradas quando da seleção de tecido muscular para transplantação. No entanto, como o músculo é altamente adaptativo (plástico fantástico), é provável que o músculo esquelético venha a ser um dos primeiros tecidos (a par da pele) a ser alvo de engenharia *ex vivo* completa para transplantação *in vivo*.



Quadro de teste clínico

Diagnóstico de infarto do miocárdio

O infarto do miocárdio (IM) é o resultado do bloqueio do fluxo sanguíneo para o coração. O dano do tecido resulta na liberação de enzimas intracelulares para o sangue (Fig. 20.7). Entre estas estão as enzimas glicolíticas, como a LDH (Cap. 12); contudo, as dosagens de mioglobina, CK plasmática total e isoenzimas CK-MB são geralmente mais usadas para o diagnóstico e acompanhamento do tratamento do IM. A mioglobina, uma proteína pequena (17 kDa), se eleva rapidamente no plasma, em 2 horas após o IM. Embora seja um teste sensível, não é específico do tecido cardíaco. Ela é retirada rapidamente pela filtração renal e retorna ao normal em um dia. Uma vez que a mioglobina plasmática também aumenta após um trauma do músculo esquelético, não seria útil para o diagnóstico de IM, por exemplo, após um acidente automobilístico. Os níveis plasmáticos totais de CK e das isoenzimas CK-MB começam

a aumentar entre 3 e 10 horas após um IM, e atingem um valor de pico até 25 vezes o valor normal após 12-30 horas; eles podem permanecer elevados por 3 a 5 dias. Os níveis de CK total podem também aumentar como resultado de dano do músculo esquelético, mas a dosagem de CK-MB oferece especificidade para o dano cardíaco.

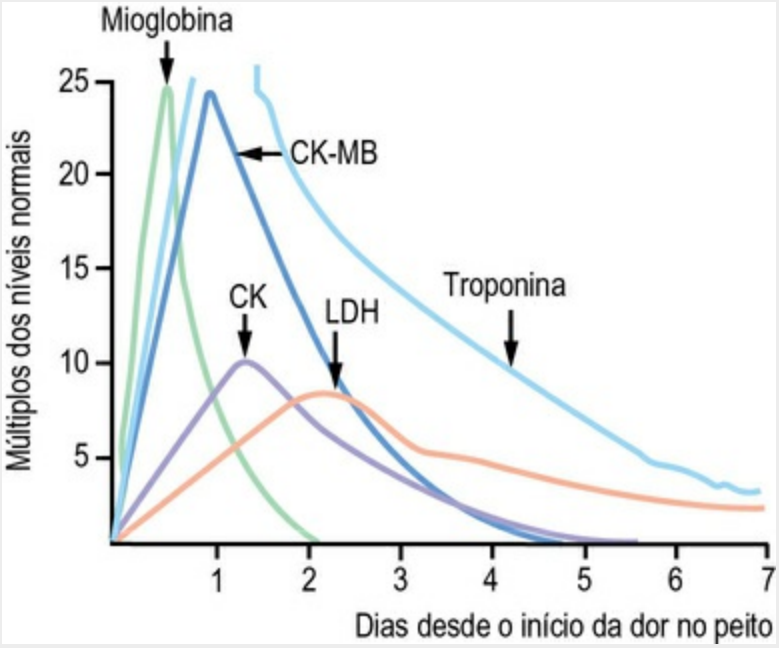


FIG. 20.7 Alterações das enzimas séricas após infarto do miocárdio (IM).
Várias enzimas marcadoras se elevam no plasma após um IM. Estas são ainda utilizadas para o diagnóstico de IM, mas o teste recomendado atualmente é a determinação da concentração sérica de troponina. CK, creatina fosfocinase; CK-MB, isozima cardíaca da CK; LDH, lactato desidrogenase. Adaptado de Pettigrew AR, Pacanis A: Diagnosis of myocardial infarction. In: Dominiczak MH, editor: *Seminars in clinical biochemistry*, Glasgow, 1997, University of Glasgow Computer Publishing Unit.

Comentário

Ensaios de imunoabsorção ligada a enzimas (ELISA) para troponinas miocárdicas são atualmente recomendados para o diagnóstico e acompanhamento do tratamento do IM. Esses testes dependem da presença de isoformas únicas de subunidades de troponina no coração adulto. A concentração de Tn-T no plasma aumenta em poucas horas após o ataque cardíaco, atinge picos de até 300 vezes a concentração normal do plasma e pode permanecer elevada por uma a duas semanas. Um ensaio para uma isoforma específica no coração adulto, Tn-T_2, é essencialmente 100% sensível para o diagnóstico do IM e apresenta menos de 5% de resultados falso-positivos. Aumentos significativos da Tn-T_2 plasmática são detectáveis mesmo em pacientes com angina instável e episódios transitórios de isquemia no coração. As troponinas são comumente usadas como um componente de um algoritmo para diferenciar pacientes de alto risco dos de baixo risco em se tratando da necessidade de intervenção invasiva imediata. A definição recente de infarto do miocárdio é baseada na observação das concentrações séricas de troponina.

Os mioblastos terminalmente diferenciados no coração são denominados miócitos

cardíacos; estas células permanecem mono ou binucleadas ao longo de suas vidas. O coração tem uma capacidade regenerativa muito limitada, pelo que os efeitos de um infarto do miocárdio são duradouros. Os mioblastos do músculo liso se diferenciam em suas células musculares lisas maduras (CML). No entanto, as CML, ao contrário dos músculos cardíaco e esquelético, não são terminalmente diferenciadas. Os fenótipos das CML também variam, com base em sua localização e função. As CML são encontradas por todo o corpo na parede vascular e retêm a capacidade de proliferar, como, por exemplo, em resposta à hipertensão ou durante a angiogênese.

Efeito do exercício

O treinamento de força ou de resistência aumenta a massa muscular

Uma mudança no uso diário do músculo esquelético tem um efeito profundo em sua capacidade funcional. Quer um aumento quer uma diminuição do nível de atividade diária podem alterar a estrutura muscular, a capacidade de produção de força e a suscetibilidade à fadiga. Sob um ponto de vista bioquímico, essas mudanças são causadas primariamente por alterações na perfusão do tecido e em enzimas metabólicas e, portanto, na capacidade de o músculo captar glicose, utilizar gordura como fonte de energia e produzir ATP. A quantidade e intensidade de atividade física diária ocorrem em um *continuum*, e a adaptação do músculo a isso ocorre em resposta ao estresse específico que lhe é imposto. Por uma questão de simplicidade, e porque esta é a forma como a maioria dos estudos de investigação é desenhada, podemos separar o uso aumentado (treinamento de exercício) em duas categorias: treinamento de força e aeróbico. O propósito primário do treinamento de força, também chamado de treino de resistência, é o aumento da capacidade de um músculo ou conjunto de músculos específicos produzirem força. Isso é tipicamente conduzido através de um pequeno número de repetições de um movimento de exercício contra uma resistência que somente permite que o músculo contraia, em toda a amplitude de movimento, um número de vezes muito limitado (p. ex., 6-8 repetições de rosca bíceps). O objetivo primário do treinamento aeróbico, também denominado treino de persistência (do termo em inglês, *endurance*), é o aumento da persistência e a diminuição da fadiga durante a atividade física prolongada e de menor intensidade, por exemplo, a corrida ou a caminhada. Isso é alcançado através de um elevado número de repetições de contrações musculares com baixa resistência. Cada contração muscular no treinamento de força pode representar 75-90% da produção de força voluntária máxima desse músculo, enquanto em uma sessão de treinamento aeróbico ela pode ser de 15-20%. As alterações bioquímicas em resposta a estes tipos de exercício são distintas.

O treinamento de força tem efeitos mínimos na bioquímica muscular. O aumento da capacidade de produção de força que ocorre com o treinamento de força é devido ao aumento do tamanho celular, isto é, à hipertrofia. A hipertrofia de células musculares individuais ocorre como resultado de um aumento das proteínas estruturais e do sarcômero. Com mais miofibrilas e sarcômeros (as unidades contráteis do músculo),

surge um aumento da capacidade de produção de força. Quando as enzimas glicolíticas são examinadas e normalizadas relativamente ao tamanho celular aumentado, não há alteração com o treino de força. Quando a atividade enzimática mitocondrial é normalizada relativamente ao tamanho celular aumentado do treinamento de força, existe usualmente um ligeiro decréscimo, sugerindo que, enquanto a capacidade de produção de força aumenta, a capacidade de produção de ATP (baseada, pelo menos, no tamanho da célula) diminuiu ligeiramente. A velocidade de contração e dos ciclos de formação de pontes cruzadas no sarcômero é primariamente determinada pela atividade miosina-ATPase, que permanece relativamente inalterada em resposta ao treinamento de resistência.

O treinamento de persistência ou aeróbico aumenta a capacidade metabólica oxidativa do músculo

Em resposta ao treinamento aeróbico, a alteração bioquímica primária é um aumento da capacidade de metabolizar gordura, suportada por aumentos no número, tamanho e enzimas mitocondriais. Todos os tipos de fibras musculares (rápidas e lentas) aumentarão sua concentração e atividade de citrato sintetase e de citocromo *c* duas a três vezes, resultando em uma produção aumentada de ATP a uma dada carga de trabalho (isto é, intensidade de exercício), de modo que o músculo possa então depender mais da oxidação de gordura e menos do metabolismo anaeróbico. A mudança em direção ao metabolismo aeróbico retarda a fadiga muscular; ocorrem apenas efeitos mínimos nas enzimas glicolíticas em resposta ao treinamento aeróbico, e os efeitos no tamanho celular devido ao treinamento aeróbico também são ligeiros. Pequenas mudanças na composição miosina-ATPase podem também ocorrer, levando a um fenótipo muscular mais lento (menor formação de pontes cruzadas durante a contração) devido ao treinamento aeróbico. Aumentos na utilização de glicose, como resultado da expressão aumentada do GLUT-4 e da hexocinase, também se desenvolvem em resposta ao treinamento aeróbico, ao contrário do treinamento de força; mas é fácil de ver, considerando a quantidade de músculo esquelético no organismo, como a glicose sanguínea é diminuída por um programa de exercícios em uma pessoa com diabetes. Deve-se também ter em conta que quase todas essas adaptações ocorrerão em sentido contrário em resposta a qualquer forma de falta de treinamento, quer devido à cessação de um programa de exercícios ou ao acamamento devido a lesão ou doença. O uso diminuído do músculo o torna metabolicamente muito menos eficiente; infelizmente, esta desadaptação se torna aparente poucos dias após a cessação do exercício. Outros fatores induzidos pelo treinamento de persistência incluem alterações no débito cardíaco, em aumentos da densidade capilar e nas reservas de glicogênio. De importância crítica para a saúde e para a medicina é o *continuum* em que estas adaptações ocorrem e o fato de que pequenas alterações podem se repercutir em muitas doenças crônicas, incluindo diabetes, aterosclerose e caquexia associada ao câncer. Além disso, em ocorrendo alterações relativamente ao estado original do músculo, pessoas mais velhas e sedentárias verão respostas na bioquímica muscular comparáveis às observadas em pessoas mais jovens. Assim, independentemente da idade, indivíduos sedentários que iniciem um programa

de exercícios, mesmo que moderados, podem experimentar adaptações bioquímicas substanciais e benefícios para a saúde. Muita pesquisa se encontra ainda em curso nestas áreas, na tentativa de compreender a genética molecular e as vias de sinalização responsáveis por essas respostas, e perceber como poderão ser modificadas após lesão ou doença.

Resumo

- O músculo é o maior consumidor de combustíveis e ATP no organismo. A glicogenólise, a glicose sanguínea, a glicólise e o metabolismo lipídico são essenciais para a atividade muscular ótima. A dependência dessas vias de produção de energia varia com o tipo de músculo e sua atividade contrátil prioritária.
- Os músculos esquelético, cardíaco e liso têm em comum um complexo actomiosina contrátil, mas diferem na inervação, no arranjo de proteínas contráteis, na regulação da contração pelo cálcio e na propagação célula a célula da despolarização.
- O sarcômero é a unidade contrátil fundamental do músculo estriado e é definido pelas linhas Z e pela sobreposição de filamentos espessos e finos.
- A contração é descrita pelo modelo do "deslizamento de filamentos", no qual a hidrólise de ATP é catalisada por um influxo de Ca^{2+} no sarcoplasma e é acoplada a alterações de conformação da miosina. O relaxamento da conformação de alta energia da miosina durante a interação com a actina produz o "golpe de força", resultando em crescente sobreposição dos filamentos de actina e miosina e no encurtamento do sarcômero.
- O ATP produzido no músculo controla a manutenção de gradientes iônicos, o restabelecimento dos níveis de cálcio intracelulares e o processo contrátil.
- O músculo rápido glicolítico depende muito do glicogênio e da glicólise anaeróbica para explosões curtas, de alta intensidade, da atividade muscular.
- O músculo lento oxidativo é um tecido aeróbico; em repouso, utiliza gorduras como sua principal fonte de energia. Durante as fases iniciais de exercício, ele depende da glicogenólise e da glicólise, mas depois, gradativamente, se adapta ao metabolismo de gorduras para a produção de energia a longo prazo. As enzimas e proteínas são liberadas a partir do músculo em resposta à lesão.
- As medições da atividade da CK-MB plasmática e da concentração de troponina são utilizadas como biomarcadores de lesão do músculo cardíaco e são usadas comumente no diagnóstico e tratamento do infarto do miocárdio.
- O exercício é um bom remédio; ele aumenta a sensibilidade à insulina e a disponibilização de glicose, e auxilia na manutenção da massa e da função muscular durante o envelhecimento.

Questões para aprendizagem

1. Quando as galinhas são assustadas, elas cacarejam muito, podem saltar alto e voar por curtas distâncias, mas são incapazes de alçar voo e voar a grandes distâncias, quer normalmente ou para escapar do perigo. Pelo contrário, os gansos têm a

capacidade de voar por longas distâncias durante as migrações semianuais. Compare os tipos de fibras musculares e as fontes de energia no peito das galinhas e dos gansos e explique como as diferenças no tipo de fibras são compatíveis com a capacidade de voo dessas aves.

2. Discuta o impacto da deficiência da fosforilase do glicogênio muscular (doença de McArdle) e a deficiência da carnitina ou da carnitina palmitoil transferase I na *performance* muscular durante os exercícios de curta e longa duração.
3. Reveja os méritos do *doping* sanguíneo, da carga de carboidratos e da suplementação de creatina para aumentar o desempenho durante provas de maratona.

Leituras sugeridas

Cooke, R. The sliding filament model: 1972-2004. *J Gen Physiol*. 2004; 123:643–656.

Mayer, F., Scharhag-Rosenberger, F., Carlsohn, A., et al. The intensity and effects of strength training in the elderly. *Dtsch Arztebl Int*. 2011; 108:359–364.

Mitchell, W. K., Williams, J., Atherton, P., et al. Sarcopenia, dynapenia, and the impact of advancing age on human skeletal muscle size and strength; a quantitative review. *Front Physiol*. 2012; 3:260.

Muscaritoli, M., Lucia, S., Molfino, A., et al. Muscle atrophy in aging and chronic diseases: is it sarcopenia or cachexia? *Intern Emerg Med*. 2013; 8:553–560.

Shave, R., Baggish, A., George, K., et al. Exercise-induced cardiac troponin elevation: evidence, mechanisms, and implications. *J Am Coll Cardiol*. 2010; 56:169–176.

Tiwari, R. P., Jain, A., Khan, Z., et al. Cardiac troponins I and T: molecular markers for early diagnosis, prognosis, and accurate triaging of patients with acute myocardial infarction. *Mol Diagn Ther*. 2012; 16:371–381.

Sites

Muscular dystrophies, www.muscular-dystrophy.org/conditions.

Animations: numerous excellent videos of muscle structure and contraction at www.youtube.com.

CAPÍTULO 21

Homeostasia da Glicose e Metabolismo Energético: Diabetes Melito

Marek H. Dominiczak

Objetivos

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Caracterizar os principais substratos energéticos (combustíveis metabólicos).
- Reconhecer as ações da insulina e do glucagon.
- Comparar o metabolismo nos estados de jejum e pós-prandial.
- Descrever a resposta metabólica à lesão e compará-la com o metabolismo no diabetes.
- Caracterizar o diabetes tipo 1 e tipo 2.
- Explicar os princípios dos testes laboratoriais relevantes para o metabolismo energético e para a monitorização do diabetes.

Introdução

O fornecimento contínuo de energia é essencial para a manutenção da vida. Este capítulo descreve o metabolismo de compostos conhecidos como substratos energéticos (ou combustíveis metabólicos). Também se discute a doença metabólica mais comum, o diabetes melito.

A glicose e os ácidos graxos são os substratos energéticos mais importantes: ambos podem ser armazenados no organismo

Os substratos energéticos mais importantes nos mamíferos são a glicose e os ácidos graxos. Após a ingestão de alimentos, o excesso de substratos energéticos é armazenado para ser liberado novamente em caso de necessidade. Esse paradigma armazenamento-liberação assegura o fornecimento de energia entre as refeições, e em circunstâncias extremas pode garantir a sobrevivência de um organismo durante semanas ou meses. As

principais vias do metabolismo energético e os metabólitos-chave estão listados na Tabela 21.1.

Tabela 21.1

Principais vias catabólicas e anabólicas, e seus principais substratos e produtos

Vias	Principais substratos	Produtos finais
Anabólicas		
Gliconeogênese	Lactato, alanina, glicerol	Glicose
Síntese de glicogênio	Glicose-1-fosfato	Glicogênio
Síntese proteica	Aminoácidos	Proteínas
Síntese de ácidos graxos	Acetil-CoA	Ácidos graxos
Lipogênese	Glicerol, ácidos graxos	Triacilgliceróis (triglicerídios)
Catabólicas		
Glicólise	Glicose	Piruvato, ATP
Ciclo do ácido tricarboxílico	Piruvato	NADH + H^+, $FADH_2$
		CO_2, H_2O, ATP
Glicogenólise	Glicogênio	Glicose-1-fosfato, glicose
Via dos fosfatos de pentose	Glicose-6-fosfato	NADPH + H^+, pentoses, CO_2
Oxidação de ácidos graxos	Ácidos graxos	Acetil-CoA, CO_2, H_2O, ATP (corpos cetônicos)
Lipólise	Triglicerídios	Glicerol, ácidos graxos
Proteólise	Proteínas	Aminoácidos, glicose

Note que metabólitos como o piruvato e a acetil-CoA são comuns a diferentes vias. Note ainda quais as vias que geram equivalentes redutores (NADH, NADPH e $FADH_2$), que por sua vez são os substratos da cadeia respiratória mitocondrial.

O metabolismo é direcionado para salvaguardar o fornecimento contínuo de glicose. A glicose é armazenada como glicogênio e pode também ser sintetizada a partir de compostos não carboidratos

O fornecimento contínuo de glicose é essencial para a sobrevivência, uma vez que, em circunstâncias normais, é o único combustível que o cérebro pode utilizar. A glicose é também o combustível preferencialmente utilizado pelo músculo durante as fases iniciais do exercício. Apesar de ocasionalmente existir grande necessidade de glicose, a quantidade presente no fluido extracelular é apenas cerca de 20 g, o equivalente a 80 kcal (335 kJ). Para assegurar seu fornecimento, a glicose pode ser liberada para a circulação a partir da "reserva de emergência" de seu polímero, o **glicogênio.** O glicogênio é armazenado no fígado (aproximadamente 75 g) e no músculo (400 g). Isso equivale a cerca de 1.900 kcal (7.955 kJ) e pode fornecer glicose durante aproximadamente 16 horas de jejum (compare as Tabelas 19.1 e 20.3). Quando o período de jejum é mais longo, outro mecanismo de fornecimento de glicose entra em ação: sua síntese *de novo* a partir de compostos não carboidratos, conhecida como **gliconeogênese.**

Os ácidos graxos são armazenados como ésteres de glicerol (triacilgliceróis ou triglicerídios)

O organismo tem uma capacidade virtualmente ilimitada de acumular gordura no tecido adiposo sob a forma de ésteres de glicerol (triacilgliceróis). O valor calórico da gordura (9 kcal/g, 37 kJ/g) é maior que o dos carboidratos (4 kcal/g, 17 kJ/g) ou o das proteínas (4 kcal/g) (Tabela 21.2). Um homem de 70 kg armazena aproximadamente 15 kg de gordura. Isso equivale a mais de 130.000 kcal (544.300 kJ), uma grande quantidade quando comparada com o valor calórico do glicogênio armazenado. Os ácidos graxos suportam as necessidades energéticas durante longos períodos de jejum e durante o exercício prolongado. Em circunstâncias extremas, uma pessoa é capaz de permanecer em jejum por períodos de 60 a 90 dias: pessoas obesas podem sobreviver mais de um ano sem alimento.

Tabela 21.2

Efeitos recíprocos da insulina e glucagon nas enzimas-chave da gliconeogênese

Enzima	Efeito do glucagon	Efeito da insulina
Glicose-6-fosfatase (Glc-6-Pase)	Indução	Repressão
Frutose-1,6-bifosfatase (Fru-1,6-BPase)	Indução	Repressão
Fosfoenolpiruvato carboxicinase (PEPCK)	Indução	Repressão

Em uma dieta rica em carboidratos, a insulina induz a transcrição gênica das enzimas glicolíticas glicocinase, fosfofrutocinase (PFK), piruvato cinase (PK) e da glicogênio sintase. Ao mesmo tempo inibe as enzimas-chave da gliconeogênese, piruvato carboxilase (PC), PEPCK, Fru-1,6-BPase e Glc-6-Pase. O glucagon tem os efeitos opostos aos da insulina.

Em uma dieta rica em gordura, o glucagon inibe a síntese da glicocinase, PFK-1 e PK, e induz a transcrição da PEPCK, Fru-6-Pase e Glc-6-Pase.

Os aminoácidos podem ser utilizados como combustível após conversão em glicose

Os aminoácidos são normalmente utilizados como substratos para a síntese de proteínas do organismo. No entanto, em determinadas situações tornam-se substratos energéticos. Durante um jejum prolongado ou em períodos de estresse metabólico induzido por doença ou lesão, as proteínas corporais são degradadas, e os aminoácidos liberados são convertidos em glicose pela gliconeogênese. Quando uma quantidade excessiva de proteínas é consumida na alimentação, estas são convertidas em carboidratos, que são metabolizados ou armazenados (Cap. 19).

Diferentes órgãos e tecidos lidam com os combustíveis de forma diferente

Em repouso, **o cérebro** utiliza aproximadamente 20% de todo o oxigênio consumido pelo organismo. A glicose é normalmente seu único combustível: no entanto, durante o jejum, o cérebro se adapta à utilização de corpos cetônicos como fonte alternativa de energia.

As duas vias que fornecem glicose são a glicogenólise e a gliconeogênese. Quando a concentração de glicose no fluido extracelular diminui, ela é reposta inicialmente pela

degradação do glicogênio hepático. No entanto, quando o período de jejum se prolonga, a gliconeogênese é iniciada. A gliconeogênese ocorre principalmente no **fígado,** e os **rins** também contribuem durante jejuns prolongados. Seus principais substratos são o lactato (da glicólise anaeróbica), a alanina (dos aminoácidos liberados durante a degradação de proteínas musculares) e o glicerol (da degradação de triacilgliceróis no tecido adiposo [Cap. 13]).

O **músculo** utiliza tanto glicose quanto ácidos graxos como fontes de energia. Durante exercícios de curta duração, a glicose é o substrato preferencial, mas em repouso e durante o exercício prolongado, os ácidos graxos são a principal fonte de energia (Cap. 20). O miócito não tem capacidade para liberar glicose diretamente na circulação, uma vez que não possui a enzima glicose-6-fosfatase. Assim, o músculo utiliza glicogênio apenas para suas necessidades energéticas. No entanto, contribui para a gliconeogênese ao liberar lactato, que é transportado para o fígado. Não ocorre gliconeogênese no músculo.

A concentração de glicose no **plasma** reflete o balanço entre, por um lado, o seu aporte (absorção pelo intestino) ou a sua produção endógena (glicogenólise e gliconeogênese), e, por outro, a sua utilização pelos tecidos na glicólise, na via dos fosfatos de pentose, no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e na síntese de glicogênio (Fig. 13.2). Em jejum, uma pessoa com 70 kg metaboliza glicose a uma taxa de aproximadamente 2 mg/kg/min (200 g/24 h).

A insulina e o glucagon são os principais hormônios que regulam a disponibilidade de glicose, sua concentração plasmática e, em geral, o estado do metabolismo energético

A homeostasia da glicose é controlada, por um lado, pelo hormônio anabólico insulina e, por outro, por hormônios catabólicos (glucagon, catecolaminas, cortisol e hormônio do crescimento) também conhecidos como hormônios contrarreguladores (Fig. 21.1). A insulina e o glucagon são ambos secretados pelas ilhotas pancreáticas de Langerhans. A insulina é secretada pelas células β (cerca de 70% do total de células das ilhotas) e o glucagon, pelas células α. A razão molar entre a insulina e o glucagon num dado momento é o determinante-chave do metabolismo energético.

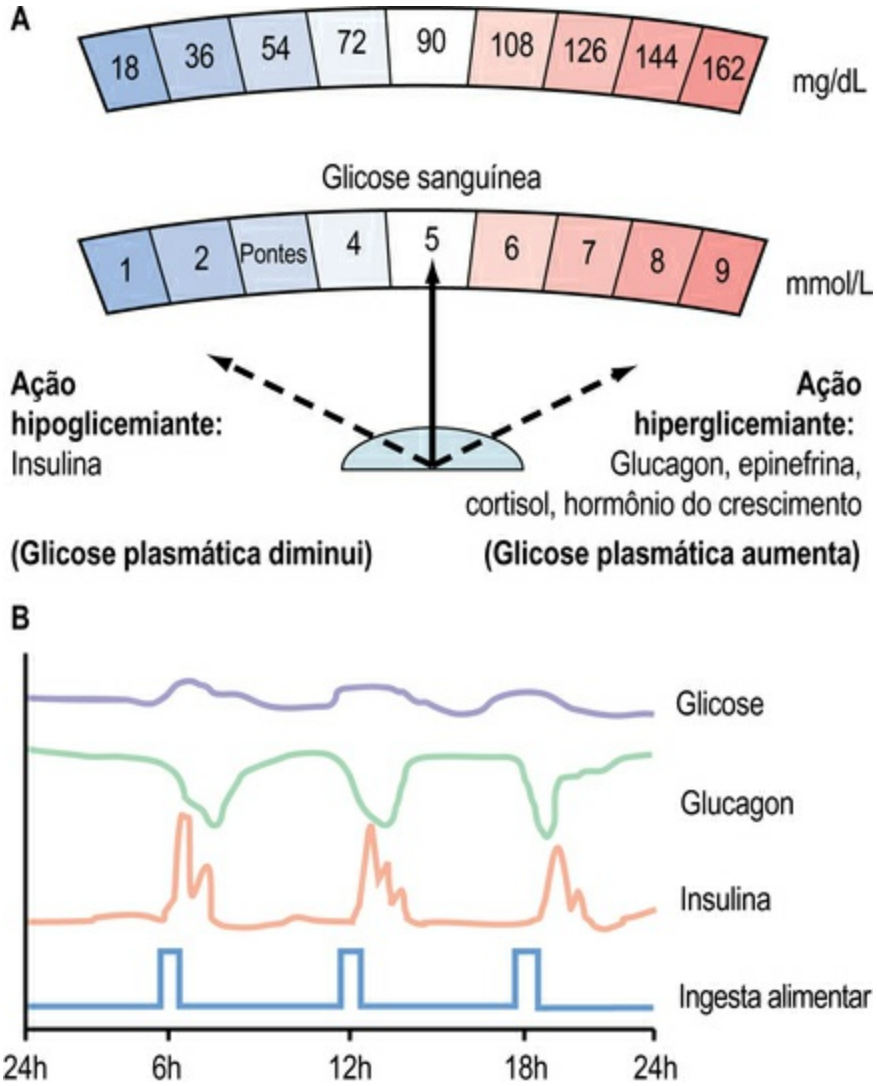


FIG. 21.1 Controle hormonal da homeostasia da glicose. **(A)** A concentração plasmática de glicose reflete o balanço entre a ação hipoglicemiante (diminuição de glicose) da insulina e a ação hiperglicemiante (aumento de glicose) dos hormônios anti-insulínicos. **(B)** Padrões diários da secreção de insulina e de glugacon, e as concentrações plasmáticas de glicose correspondentes. A concentração plasmática de glicose é mantida dentro de um intervalo estreito ao longo do dia. Para obter a concentração de glicose em mg/dL, multiplique o valor em mmol/L por 18.

Insulina

A insulina foi descoberta em 1921-22 por Frederick Banting, Charles Best e John Macleod, enquanto trabalhavam em Toronto (Leituras Sugeridas). Muito tempo depois, em 1979, a insulina tornou-se a primeira proteína humana recombinante a ser produzida comercialmente. A molécula de insulina consiste em duas cadeias peptídicas ligadas por duas ligações dissulfeto. Seu peso molecular é de 5.500 Da. A cadeia α contém 21 aminoácidos e a cadeia β contém 30 aminoácidos. A insulina é sintetizada no retículo endoplasmático rugoso das células β pancreáticas e é armazenada nas vesículas secretórias no aparelho de Golgi. O precursor da insulina é uma molécula de cadeia única, a preproinsulina. Primeiro, uma sequência sinalizadora de 24 aminoácidos é clivada da preproinsulina por uma peptidase, originando a proinsulina. A proinsulina é então clivada por endopeptidases em insulina e peptídio C (Fig. 21.2), que são ambos liberados da célula em quantidades equimolares. Isto é explorado nos laboratórios

clínicos para avaliação da função das células β em pacientes tratados com insulina. Nessas pessoas, a insulina endógena não pode ser medida diretamente, uma vez que a insulina administrada iria interferir na análise. No entanto, como o peptídio C está presente na mesma concentração molar da insulina nativa, serve de marcador de função das células β.

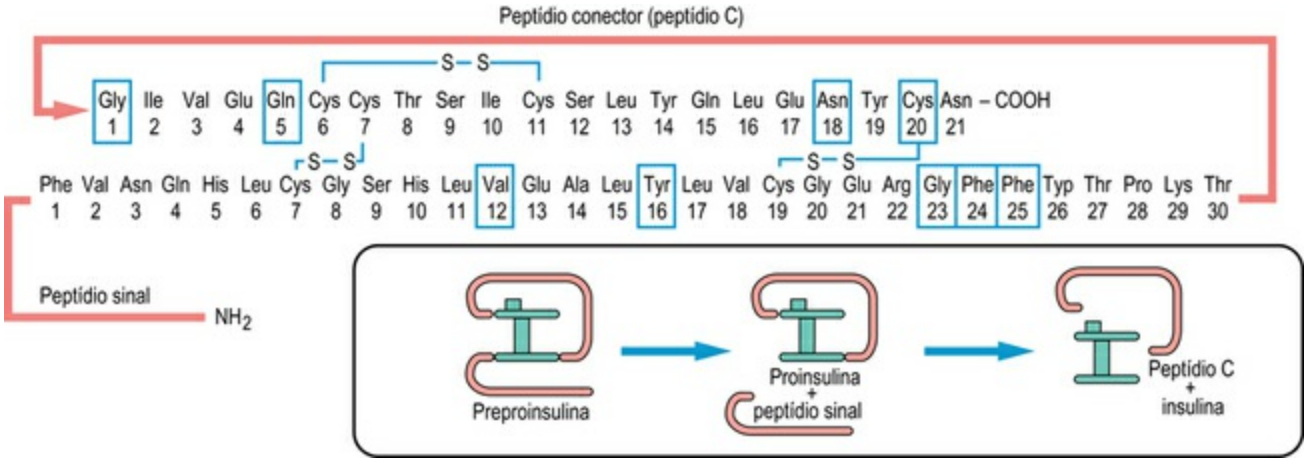


FIG. 21.2 Insulina. A molécula de insulina consiste em duas cadeias polipeptídicas unidas por duas pontes dissulfeto. A terceira ponte se encontra no interior da cadeia β. A insulina é sintetizada como um peptídio maior, preproinsulina, que é clivado no peptídio sinal e na proinsulina. Antes de ser secretada da célula β, a proinsulina ainda é clivada em peptídio C e insulina. Os quadros desenhados em volta dos resíduos de aminoácidos indicam os aminoácidos envolvidos na ligação ao receptor de insulina.

O metabolismo da glicose nas células β determina a secreção de insulina

Enquanto a glicose é absorvida durante a refeição, a célula β capta-a utilizando o transportador de membrana GLUT-2 (Cap. 8 e Tabela 8.2). Ao entrar na célula, a glicose é fosforilada pela glicocinase. Como o metabolismo da glicose é estimulado, a razão ATP/ADP na célula aumenta. Esse aumento causa o encerramento dos canais de potássio sensíveis ao ATP na membrana celular, diminuindo o efluxo de potássio. A célula é despolarizada, e os canais de cálcio tipo L abrem. Os íons de cálcio entram na célula (Cap. 40) e ativam as proteínas dependentes de Ca^{2+}, que causam a liberação de grânulos secretores contendo insulina pré-formada. Este processo é conhecido como a primeira fase da secreção de insulina (Fig. 21.3) (compare este processo com os grânulos neurossecretores, Cap. 41.1). A perda desta fase é o sinal funcional precoce de lesão das células das ilhotas. A segunda fase da secreção de insulina envolve a síntese de nova insulina e responde a sinais como o aumento da concentração citosólica de ácidos graxos de cadeia longa.

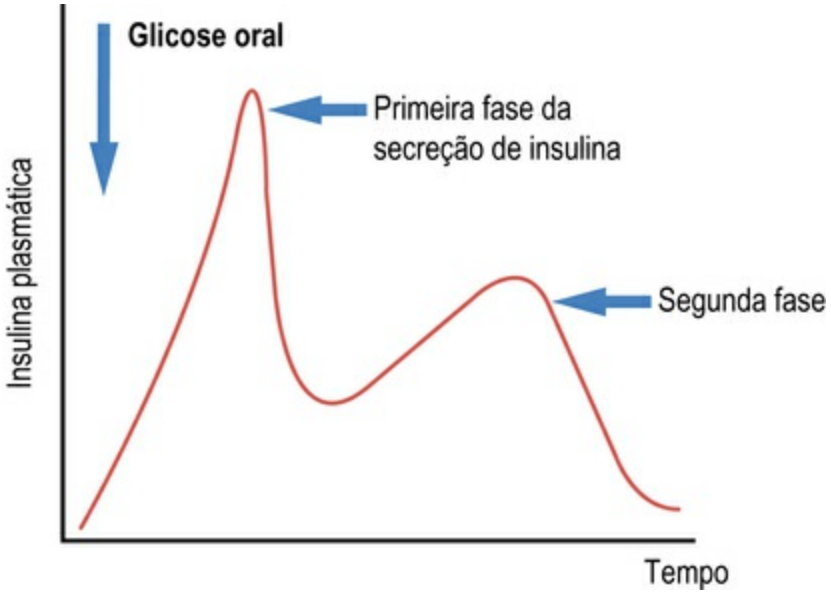


FIG. 21.3 Secreção de insulina. Note as duas fases da secreção de insulina. A glicose é o estimulador mais importante da secreção de insulina. Outros estimuladores são alguns aminoácidos (aminoácidos de cadeia ramificada), a estimulação do nervo vago e hormônios secretados pelo intestino (incretinas).

O processo de "correspondência" da secreção de insulina à concentração plasmática de glicose percebida pela célula β é conhecido como **acoplamento metabolismo-secreção.**

Ação da insulina

A sinalização da insulina nas células envolve um receptor de membrana e as cascatas de fosforilação

A propagação celular do sinal da insulina inclui múltiplas fosforilações de proteínas (Fig. 21.4; compare com a Fig. 13.7). Essas fosforilações ocorrem em diferentes locais das moléculas-alvo proteicas: a fosforilação de tirosinas envia sinais de modo diferente da fosforilação de serinas-treoninas. As fosforilações auxiliam na criação de mudanças conformacionais que permitem a ligação (acoplamento) de outras proteínas e, assim, a propagação adicional do sinal.

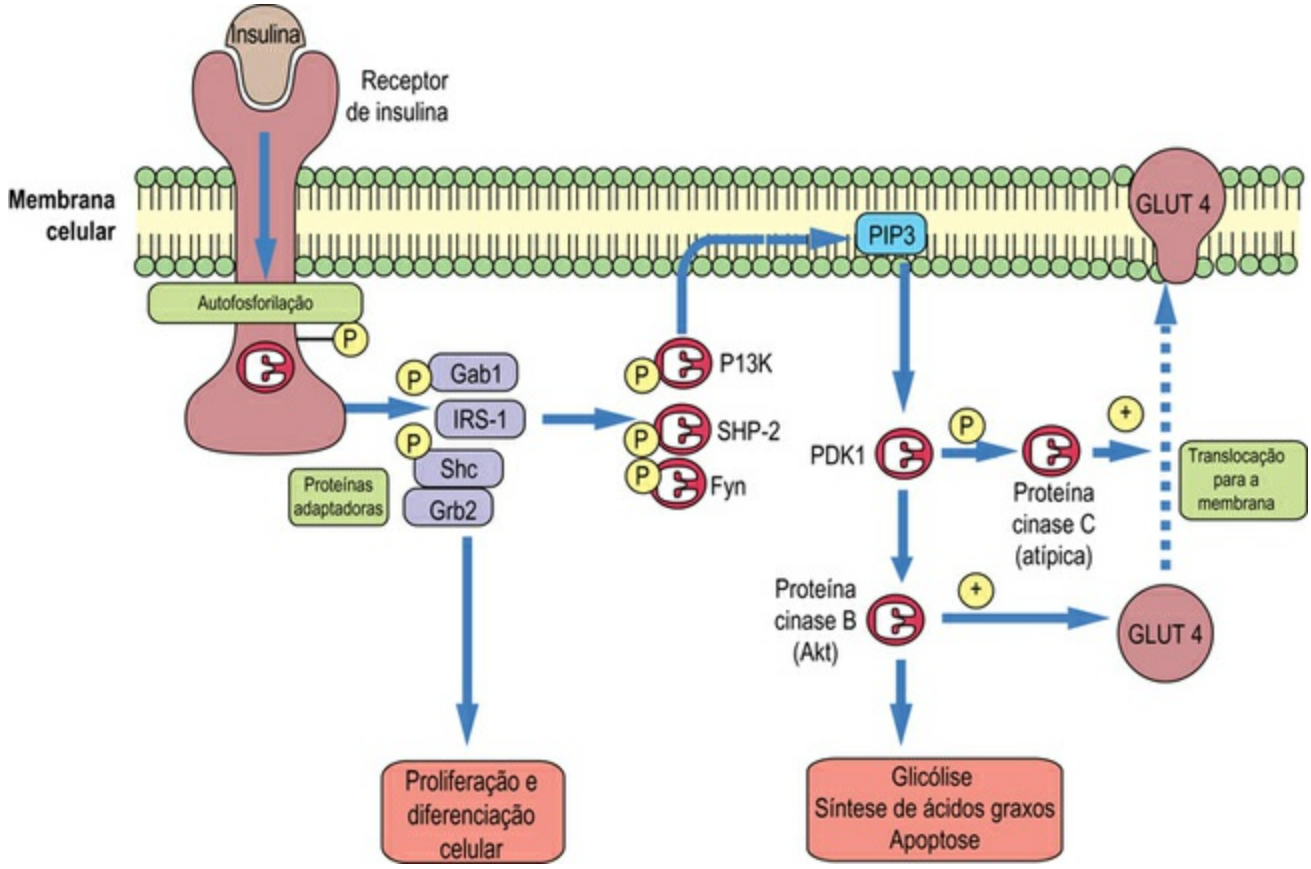


FIG. 21.4 Sinalização da insulina. A cascata de sinalização da insulina transfere o sinal da molécula de insulina para as moléculas-alvo, tais como enzimas reguladoras ou o transportador de glicose membranar GLUT-4. Uma via sinalizadora envolve a fosforilação do receptor de insulina, a fosforilação de IRS-1, a fosfoinositol-3-cinase (PI3K), e então as PDKs e duas cinases a jusante, PKB/Akt e PKC. A translocação do GLUT-4 também pode ser afetada pela via independente da PI3K (não representada). Compare com a Figura 13.7. IRS-1, substrato do receptor de insulina 1; PDK, cinase dependente de fosfoinositídio.

Primeiro, a insulina se liga ao seu receptor, uma proteína de quatro subunidades que atravessa a membrana celular da célula-alvo. Uma subunidade do receptor contém um local de ligação ao ATP e tem atividade de tirosina cinase. A ligação da insulina faz com que o receptor fosforile a ele próprio. O receptor recruta e fosforila também várias outras proteínas, como os substratos do receptor de insulina (designados IRS 1-4), as proteínas adaptadoras Gab1, Shc, Grb2 e outras. Essas proteínas, por sua vez, acoplam outro conjunto de proteínas, como a fosfatidilinositol 3'-cinase (PI3K), a proteína tirosina fosfatase (SHP2) e a cinase Fyn.

À medida que o sinal se propaga, a PI3K gera mensageiros baseados em lipídios, os fosfatos de fosfoinositol, sendo o mais importante o fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP_3; Cap. 40). Estes, por sua vez, recrutam a cinase serina-treonina **(proteína cinase B, PKB, também chamada Akt)** e as cinases dependentes de 3'-fosfoinositídio 1 e 2 (PDK1 e 2). A PDK1 fosforila a PKB e a proteína cinase C (PKC). Uma forma da PKC conhecida como PKCλε está envolvida no transporte e translocação de glicose nos adipócitos. As cinases serina-treonina podem também fosforilar o IRS-1; essa fosforilação diminui a suscetibilidade deste substrato à fosforilação pelo receptor da insulina, introduzindo mais um círculo regulador. Fosfatases, como a fosfotirosina fosfatase 1B, contribuem para a terminação do sinal da insulina.

Existe, ainda, uma **via independente da PI3K** de sinalização da insulina, que ativa

também o transporte de glicose; o receptor de insulina fosforila a proteína chamada Cbl, usando como adaptador o substrato associado à proteína (APS). A Cbl fosforilada se liga à proteína associada à Cbl (CAP). A CAP, por sua vez, liga-se à flotilina, uma proteína associada a balsas lipídicas presentes na membrana. A flotilina se acopla ao fator de troca de nucleotídios guanil (C3G) através de outra molécula adaptadora, a CrkII. Esse acoplamento ativa a proteína G chamada TC-10, que participa na translocação do **transportador GLUT-4** nos adipócitos para a membrana celular, afetando, assim, o transporte de glicose.

Efeitos metabólicos da insulina

A insulina promove o anabolismo: o armazenamento de carboidratos e lipídios, e a síntese de proteínas. Em paralelo, suprime as vias catabólicas. A insulina atua em três tecidos-alvo principais: o fígado, o tecido adiposo e o músculo esquelético (Fig. 21.5). O fígado é o principal alvo da ação da insulina em jejum. Após a refeição, os principais alvos são o músculo e o tecido adiposo. **No fígado,** a insulina estimula a glicólise e a síntese de glicogênio. Simultaneamente, suprime a lipólise e a gliconeogênese. Estimula ainda a síntese de ácidos graxos de cadeia longa e a lipogênese — a síntese de triacilgliceróis. Promove também a formação de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), que transportam lipídios para as células periféricas.

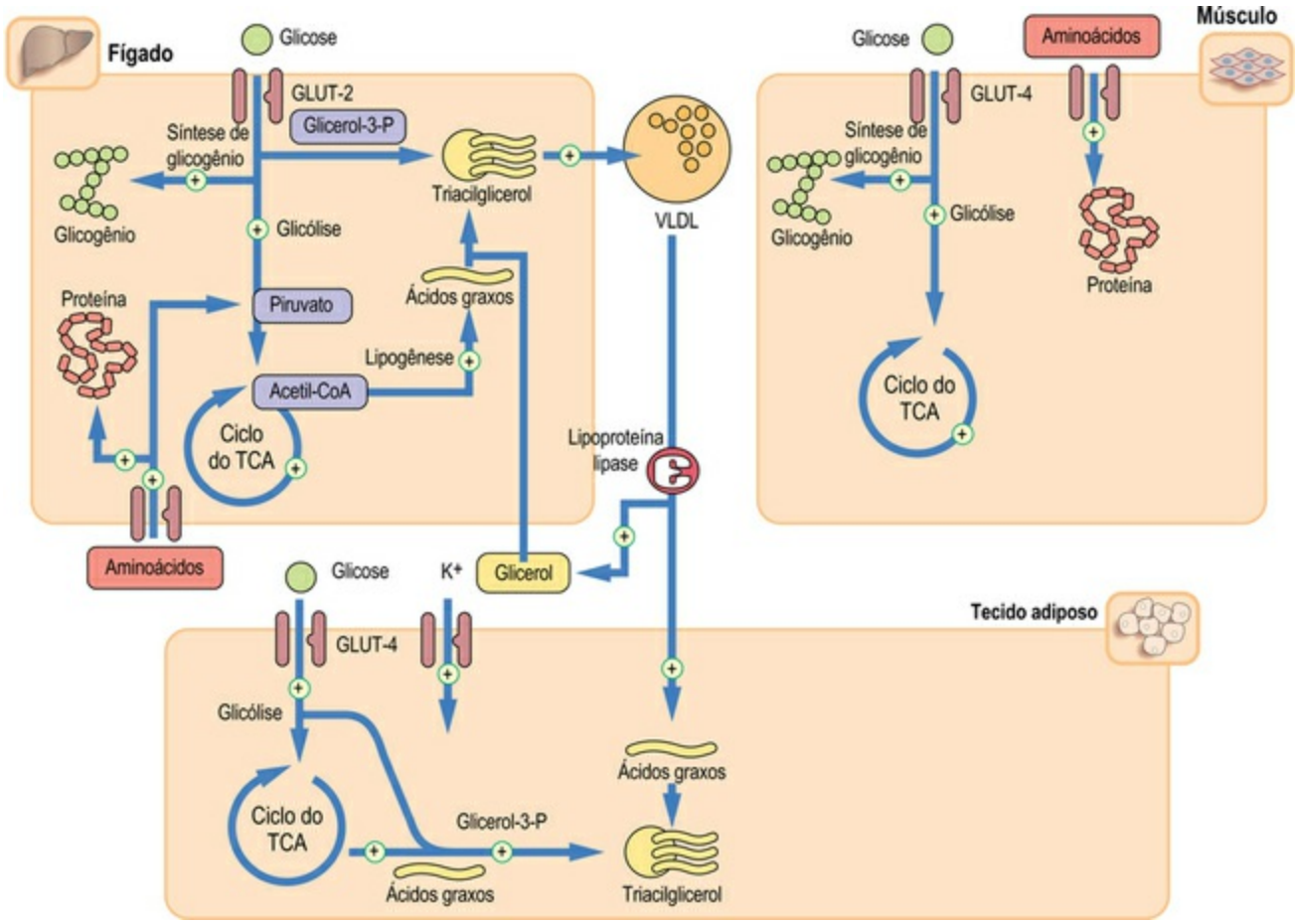


FIG. 21.5 Efeitos metabólicos da insulina. Os principais tecidos-alvo da insulina são fígado, músculo e tecido adiposo. A insulina afeta o metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas. A insulina também promove a captação de potássio pela célula. O sinal de adição indica as vias estimuladas pela insulina. Na maioria dos casos a insulina inibe os processos opostos. O transporte de glicose no músculo e no tecido adiposo é mediado pelo transportador GLUT-4 e é dependente de insulina. Por outro lado, o transportador de glicose no fígado (GLUT-2) é independente de insulina (compare com a Figura 13.7).

No tecido adiposo, a insulina estimula a síntese de triglicerídios a partir do glicerol-3-fosfato e de ácidos graxos.

No músculo, a insulina estimula o transporte e o metabolismo de glicose e a síntese de glicogênio. Aumenta a captação celular de aminoácidos e estimula a síntese proteica.

A insulina induz também a lipoproteína lipase endotelial, uma enzima que libera triacilgliceróis dos quilomícrons e das VLDL (Cap. 18).

A insulina estimula o transporte de glicose através da membrana celular

A entrada de glicose insulinodependente nas células é mediada por proteínas conhecidas como transportadores de glicose (Tabela 8.2). O transportador GLUT-4 controla a captação de glicose no músculo esquelético e nos adipócitos. O GLUT-4 circula entre os endossomos e a membrana. Em uma célula não estimulada, a maioria das moléculas de GLUT-4 está presente no compartimento intracelular, e não mais de 10% das moléculas estão na membrana plasmática. Em humanos, a insulina duplica o recrutamento de GLUT-4 para a membrana celular. É de salientar que a contração muscular aumenta a expressão de GLUT-4 independentemente da insulina. Por outro lado, os ácidos graxos diminuem a expressão de GLUT-4 no músculo.

A resistência à insulina é uma condição em que uma dada dose de insulina produz uma resposta celular inferior à esperada

A resistência à insulina afeta todos os principais tecidos responsivos à insulina. No fígado isto resulta no aumento da produção de VLDL e em um estado pró-coagulante (síntese de fibrinogênio aumentada e aumento do inibidor do ativador do plasminogênio 1, PAI-1), no músculo causa a diminuição da captação de glicose, e no tecido adiposo causa a sobreprodução de ácidos graxos livres e alterações na secreção de adipocinas (produção diminuída de adiponectina e aumentada de resistina).

Quadro de conceitos avançados

Existem vários métodos de avaliação da resistência à insulina

A resistência à insulina pode ser avaliada por testes de função, que são usados principalmente para fins de investigação. Um desses testes é o ***clamp*** **euglicêmico hiperinsulinêmico:** a insulina é infundida a uma velocidade constante juntamente com quantidades variáveis de glicose. A velocidade de infusão de glicose é ajustada para manter sua concentração plasmática entre 5-5,5 mmol/L (90-99 mg/dL). Quando é atingido um estado estacionário, a velocidade de infusão de glicose é igual à sua captação periférica e é uma medida da sensibilidade/resistência à insulina. Outros testes de resistência à insulina são baseados na prova de tolerância à glicose oral (ver a seguir) e envolvem medições frequentes da glicose plasmática e das concentrações de insulina após uma carga de glicose.

A causa mais importante de resistência à insulina é a sinalização da insulina deficiente

Em uma célula, a resistência à insulina pode ser causada por defeitos em vários níveis (Tabela 21.3). Pode existir um comprometimento na ligação da insulina ao seu receptor devido, por exemplo, a uma mutação muito rara no gene do receptor da insulina. A resistência pode também ser causada por autoanticorpos antirreceptor. As causas mais importantes são, no entanto, defeitos na via de sinalização da insulina. No diabetes tipo 2 e em pessoas com história familiar acentuada de diabetes, a via da IRS-fosfoinositol cinase pode não funcionar normalmente. Isso compromete a translocação celular de GLUT-4 e, consequentemente, a captação de glicose. A expressão reduzida e a translocação comprometida de GLUT-4 nos adipócitos (mas não no músculo esquelético) têm sido observadas na obesidade e no diabetes. Curiosamente, adipócitos de ratos deficientes em GLUT-4 (GLUT-4-*knockout*) demonstram sobre-expressão de um gene de outra proteína, a proteína de ligação ao retinol (RBP). Apesar de a RBP ser sintetizada nos adipócitos, descobriu-se que essa proteína compromete a sinalização da insulina no músculo; assim, serve como um mensageiro intertecidual que contribui para a resistência à insulina.

Tabela 21.3

Locais de resistência à insulina

Local de resistência	Possível defeito	Comentário
Pré-receptor	Anticorpos contra o receptor de insulina, molécula anormal	Raro
Receptor	Diminuição do número ou da afinidade dos receptores de insulina	Não é significativo no diabetes
Pós-receptor	Defeitos na transdução de sinal: defeito na fosforilação da tirosina, mutações nos genes que codificam o IRS-1 ou a fosfatidilinositol 3'-cinase, defeito na translocação de GLUT-4 para a membrana celular, concentração elevada de ácidos graxos	A resistência pós-receptor é o tipo mais comum de resistência à insulina

Outras causas de resistência à insulina incluem variantes de genes que codificam o IRS-1 e a fosfatidilinositol 3'-cinase. A resistência periférica à insulina, particularmente no músculo, é induzida pela presença de um excesso de ácidos graxos. Os ácidos graxos podem também exercer um efeito prejudicial diretamente na célula β. As concentrações elevadas de ácidos graxos contribuem para a resistência à insulina ao inibir a disponibilidade periférica de glicose, ao aumentar a secreção hepática de glicose e ao lesar a função das células β. A esteatose (acumulação de triacilgliceróis no fígado e músculo), que se observa em pacientes com concentrações plasmáticas de triglicerídios elevadas, também contribui para a resistência à insulina. Estes fenômenos indesejados estimulados pelo excesso de ácidos graxos são conhecidos por **lipotoxicidade.**

Efeitos metabólicos do glucagon e de outros hormônios anti-insulínicos

Os hormônios anti-insulínicos antagonizam os efeitos da insulina, promovendo a hiperglicemia

Os hormônios anti-insulínicos mobilizam glicose ao estimular a glicogenólise e a gliconeogênese. Essa estimulação leva a um aumento na concentração plasmática de glicose (hiperglicemia).

O glucagon atua no fígado

O glucagon é um peptídio de cadeia única com 29 aminoácidos e um peso molecular de 3.485 Da. O glucagon atua no fígado. Mobiliza as reservas de combustível para manter a concentração de glicose no sangue entre as refeições. Estimula a glicogenólise, a gliconeogênese (Tabela 21.2), a oxidação de ácidos graxos e a cetogênese, e inibe a glicólise, a síntese de glicogênio e a síntese de triacilgliceróis (Fig. 21.6).

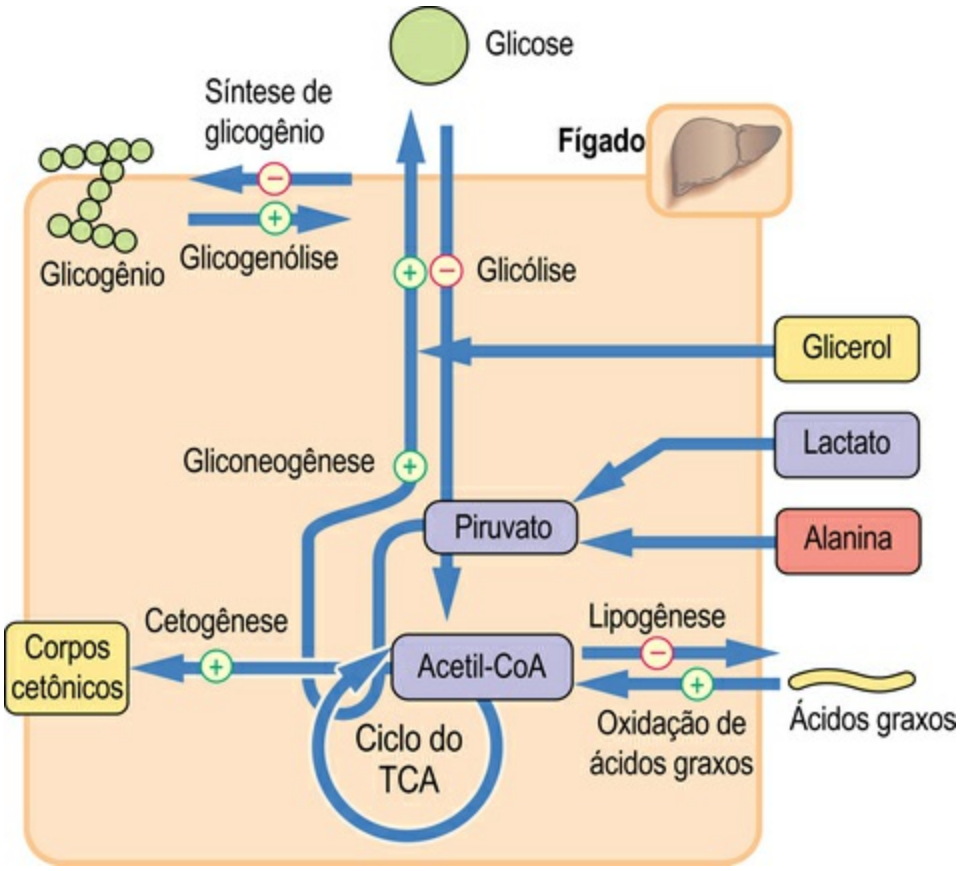


FIG. 21.6 Efeitos metabólicos do glucagon. O glucagon mobiliza glicose de qualquer fonte disponível. Também aumenta a lipólise e a cetogênese a partir de acetil-CoA. A ação do glucagon é confinada ao fígado (compare com a Fig. 13.4).

O glucagon se liga ao seu receptor de membrana próprio (Cap. 13, Fig. 13.4), que sinaliza através de proteínas-G associadas à membrana e da cascata do AMP cíclico. Primeiro, o complexo glucagon-receptor causa a ligação de guanosina 5'-trifosfato (GTP) a um complexo proteína-G (Cap. 40). Isto leva à dissociação das subunidades da proteína-G. Uma dessas subunidades ($G\alpha$) ativa a adenilato ciclase que, por sua vez, converte ATP em AMP cíclico (cAMP). O cAMP ativa a proteína cinase dependente de cAMP que, através da fosforilação de várias enzimas reguladoras, controla os passos-chave no metabolismo de carboidratos e lipídios (Figs. 21.6 e 21.7).

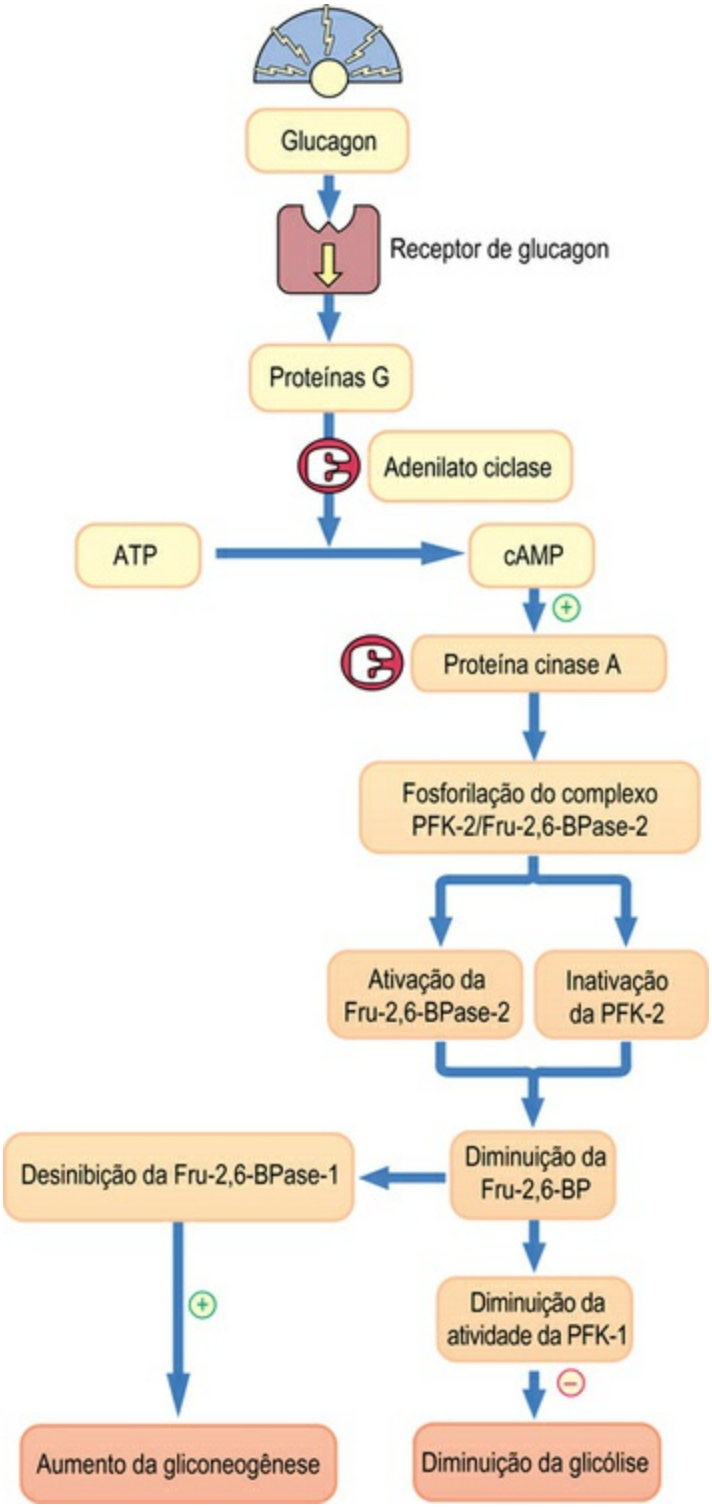


FIG. 21.7 Regulação da glicólise e da gliconeogênese pela fosfofrutocinase. O glucagon regula a gliconeogênese através do controle da enzima bifuncional com atividade de **fosfofrutocinase-2** (PKF-2) e de **frutose 2,6-bifosfatase-2** (Fru-2,6-BPase-2). O glucagon se liga a seu receptor de membrana e vai sinalizar através de proteínas G, e adenilato ciclase, gerando AMP cíclico. O cAMP, por sua vez, ativa a proteína cinase A. Subsequentemente esta cinase fosforila o complexo PFK-2:Fru-2,6-BPase. A fosforilação ativa a bifosfatase, que degrada a Fru-2,6-BP, e ao diminuir a Fru-2,6-BP desinibe outra enzima, a Fru-2,6-BPase-1, na via principal da gliconeogênese. Assim, a **gliconeogênese é estimulada.** Engenhosamente, a diminuição na Fru-2,6-BP tem um efeito inibitório recíproco na enzima-chave da glicólise, fosfofrutocinase (PFK-1). Dessa forma, a **glicólise é inibida.**

Não existem receptores de glucagon nas células musculares; a glicogenólise no músculo é estimulada por outro hormônio anti-insulínico, a epinefrina.

A epinefrina atua no fígado e no músculo

A epinefrina (adrenalina) é um hormônio-chave responsável pela hiperglicemia em resposta ao estresse. Seus efeitos metabólicos são semelhantes aos do glucagon. Inibe a glicólise e a lipogênese e estimula a gliconeogênese. Seus receptores são os receptores α e β adrenérgicos (principalmente o receptor β_2; Fig. 13.5) que estabelecem a ligação à cascata de sinalização do cAMP.

Os hormônios regulam enzimas-chave nas vias metabólicas por vários mecanismos diferentes

A velocidade e a direção das vias metabólicas dependem da atividade de enzimas-chave (reguladoras). Os hormônios têm como alvo essas enzimas reguladoras. A regulação pode ser exercida através de vários mecanismos: indução ou repressão de genes que codificam essas enzimas, fosforilação e desfosforilação de proteínas enzimáticas, e outros mecanismos como interações ao nível do substrato e modificações alostéricas. O nível de energia da célula e seu estado redox também controlam sua atividade (Cap. 6).

Os fatores de transcrição controlam diretamente a indução de genes

A indução ou repressão de genes (Tabela 21.2) demora dias ou semanas a ter efeito, e pode ocorrer em resposta a dieta, estresse crônico ou doença. Por exemplo, a atividade de várias enzimas hepáticas é diferente em pessoas com uma dieta rica em gordura em comparação com pessoas com uma dieta rica em carboidratos.

A indução de genes é controlada por fatores de transcrição, proteínas que se ligam aos elementos de resposta em genes promotores (Fig. 35.2). Os fatores de transcrição são frequentemente alvos das cascatas de sinalização hormonal.

Alguns receptores nucleares, como os receptores ativados por proliferador de peroxissoma (PPARs), atuam como fatores de transcrição em cooperação com outros receptores nucleares. Os PPARs são alvos importantes de fármacos antidiabéticos (Fig. 21.9).

A fosforilação é um mecanismo regulador-chave nas vias metabólicas e cascatas de sinalização

A fosforilação e desfosforilação é um mecanismo regulador de ação rápida. Comumente controla as enzimas-chave nas vias metabólicas. Este processo é ainda adicionalmente ajustado por envolver vários níveis de cinases e fosfatases. A fosforilação/desfosforilação pode também regular fatores de transcrição. A Figura 21.8 ilustra como este mecanismo funciona na glicogenólise, na gliconeogênese e na lipólise.

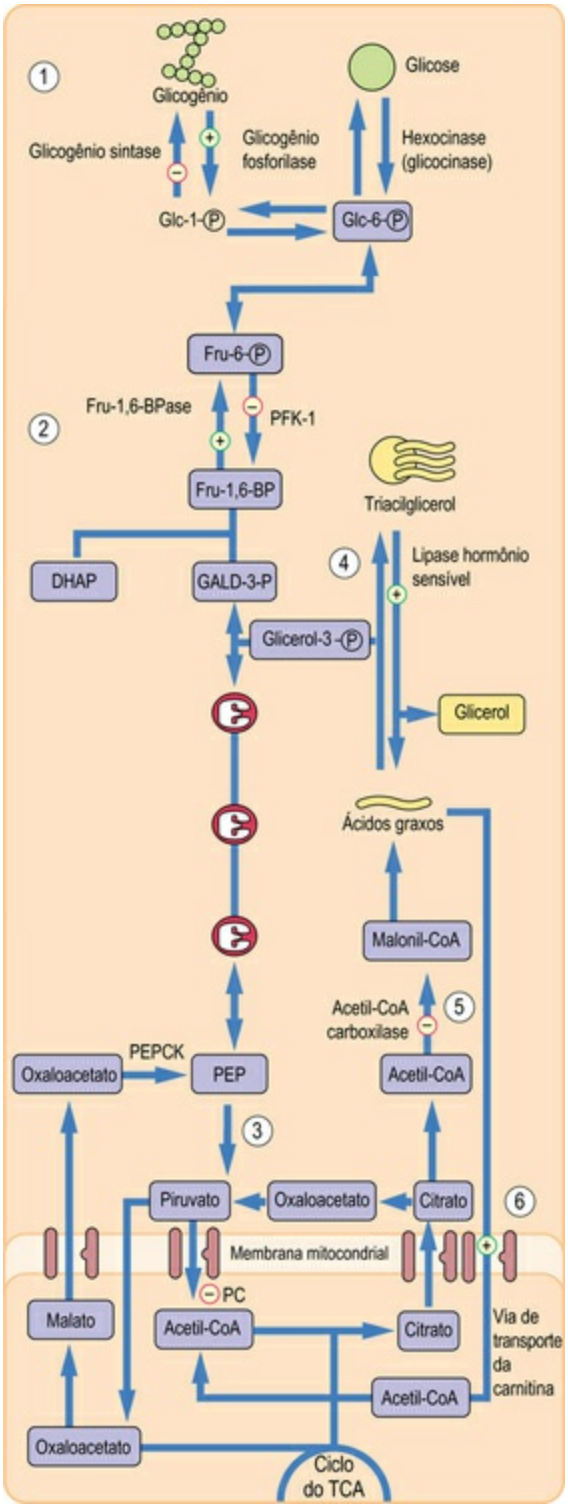


FIG. 21.8 Função reguladora da fosforilação enzimática. A fosforilação de enzimas-chave, controlada pelo glucagon e epinefrina, é o principal mecanismo de regulação do metabolismo dos carboidratos e lipídios. A fosforilação geralmente estimula as enzimas das vias catabólicas e inibe as enzimas das vias anabólicas. **Regulação do metabolismo do glicogênio:** a glicogênio fosforilase é ativada e a glicogênio sintase é inativada. Isso promove a quebra do glicogênio (1). **Regulação da gliconeogênese:** a Fru-2,6-BPase-2 é ativada e a PFK-2 é inibida. Isso vai diminuir a formação de Fru-2,6-BP, que por sua vez inibe a PFK-1 (glicólise) e estimula a FBPase (gliconeogênese) (2). **Regulação da glicólise:** normalmente, a Fru-1,6-BP também ativa alostericamente a piruvato cinase a jusante na via glicolítica. Como sua formação está diminuída, a glicólise diminui (3). **Regulação da lipólise:** a fosforilação estimula a lipase hormônio sensível, estimulando a lipólise (a liberação de ácidos graxos a partir dos triglicerídios) (4). **Regulação da oxidação de ácidos graxos:** a fosforilação inibe a acetil-CoA carboxilase, inibindo a formação de malonil-CoA (5). O malonil-CoA normalmente inibe a carnitina-palmitoil transferase-1. A falta de malonil-CoA vai desinibi-la (6), facilitando a entrada de ácidos graxos na mitocôndria. Isso estimula a oxidação lipídica. DHAP, di-hidroxiacetona fosfato; GALD-3-P, gliceraldeído-3-fosfato; PEP, fosfoenolpiruvato.

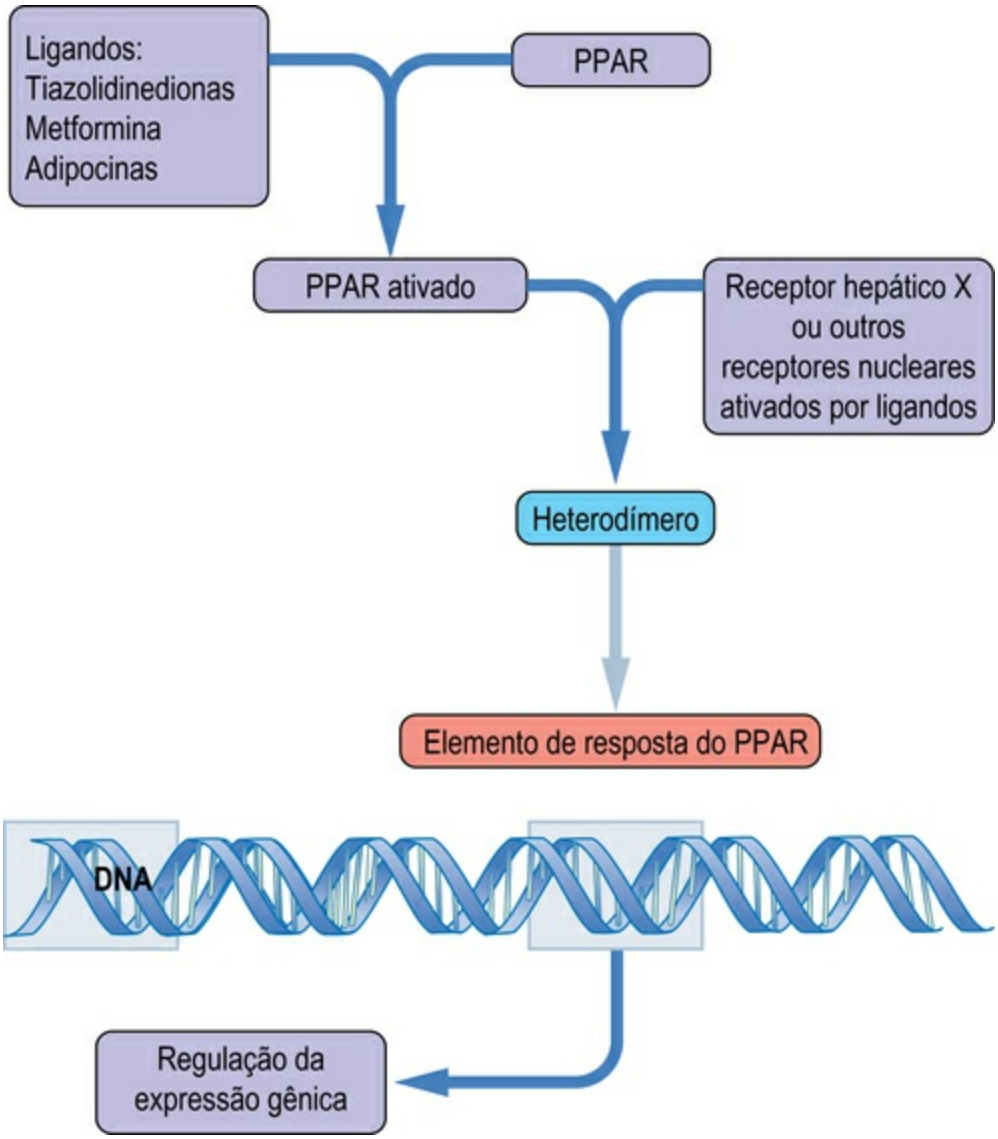


FIG. 21.9 Regulação da transcrição pelos receptores ativados por proliferador de peroxissoma (PPARs). Os PPARs são ativados por ligandos que podem ser metabólitos ou fármacos. Formam complexos heterodiméricos com uma série de outros receptores nucleares. Os complexos resultantes se ligam aos elementos de resposta dos PPARs localizados nos promotores dos genes, regulando a expressão gênica.

A insulina e o glucagon ligam e desligam genes durante o ciclo alimentação/jejum

A insulina regula a síntese de enzimas-chave ao controlar a atividade dos chamados fatores de transcrição em cabeça de garfo (possuem uma estrutura hélice-alça-hélice com duas laçadas ou asas adicionais). Dois desses fatores de transcrição, a proteína *forkhead* box 1 (FOXO1) e a HNF-3B (FOXA2), são essenciais para a alteração do metabolismo de anabolismo para catabolismo. A FOXO1 promove a gliconeogênese no fígado no estado de jejum, e a FOXA2 regula a oxidação de ácidos graxos. São ambas inativadas pela fosforilação por cinases na via IRS-1/PKB/Akt. A FOXO1 e seus coativadores PGC-1 e TORC2 (sendo este último responsivo ao cAMP) estimulam a gliconeogênese ao ativar os genes que codificam as enzimas limitantes fosfoenolpiruvato carboxicinase (PEPCK) e Glc-6-Pase.

Durante a alimentação, a insulina, novamente através da via do IRS-PKB/Akt, fosforila e inativa a FOXO1. Essa fosforilação inibe a gliconeogênese hepática. A insulina também inativa o TORC2. O glucagon, por outro lado, desfosforila o TORC2, ativando-o. Isso leva à indução de enzimas gliconeogênicas.

A FOXA2 regula a quebra de gordura no estado de jejum ao induzir genes que codificam enzimas da glicólise, da oxidação de ácidos graxos e da cetogênese. Isso leva a um aumento nas concentrações de ácidos graxos livres, corpos cetônicos e triacilgliceróis, e a uma diminuição no conteúdo hepático de triacilgliceróis. A insulina fosforila e inibe a FOXA2 através da via IRS-PKB/Akt (Fig. 21.4).

Os hormônios incretinas

Hormônios secretados no intestino potenciam a secreção de insulina

Hormônios gastrintestinais, como o **peptídio semelhante ao glucagon 1** (GLP-1) e o **peptídio insulinotrópico dependente de glicose** (também conhecido como peptídio inibidor gástrico; GIP) e também a **colecistoquinina** e o **peptídio intestinal vasoativo** (VIP), potenciam a secreção de insulina. São secretados após a ingestão de alimentos (sendo estimulados pelo aumento da concentração de glicose no lúmen intestinal). Esse processo é conhecido como **efeito da incretina** e explica o porquê de a resposta da insulina ser maior à glicose administrada oralmente do que por infusão intravenosa. A secreção de insulina é, do mesmo modo, estimulada por aminoácidos como a leucina, a arginina e a lisina.

O GLP-1 é secretado na mucosa intestinal pelas células L, principalmente no íleo distal e no cólon. O GLP-1 ocorre em duas formas, GLP-1 (7-37) e GLP-1 (7-36) amida, estando este último presente em uma maior concentração. A secreção de GLP-1 aumenta rapidamente após a refeição. Em presença de uma concentração elevada de glicose, o GLP-1 estimula o aumento da secreção de insulina pelas células β pancreáticas. Concomitantemente, promove a diminuição da secreção de glucagon e, assim, a diminuição da produção endógena de glicose. Este efeito diminui com a diminuição da concentração de glicose. O GLP-1 igualmente diminui o esvaziamento gástrico e aumenta a sensação de saciedade. Além disso, estimula a proliferação de células β. O GIP é uma molécula de 42 aminoácidos sintetizada nas células K no duodeno e no jejuno.

O GLP-1 e o GIP atuam através de receptores acoplados a proteínas G. O receptor do GLP-1 está presente nas células β e α nas ilhotas pancreáticas, assim como nos tecidos periféricos. Além de aumentarem a secreção de insulina, o GLP-1 e o GIP também estimulam a proliferação de células β e diminuem sua apoptose, atuando através da via mediada pela PKA. O GLP-1 e o GIP são inativados pela **dipeptidil peptidase 4** (DPP-4).

O ciclo alimentação-jejum

O metabolismo humano oscila estre o estado alimentado e o estado de jejum. O "interruptor" que determina as mudanças metabólicas é o **quociente molar entre a**

insulina e o glucagon plasmáticos. O **estado alimentado** (também chamado estado absortivo ou pós-prandial) ocorre durante a refeição e nas horas seguintes, e é caracterizado por concentrações elevadas de insulina e baixas de glucagon (uma razão insulina/glucagon elevada). O **jejum,** por outro lado, é um estado de insulina baixa/glucagon alto. Um jejum de 6-12 horas é chamado de **estado pós-absortivo.** Um jejum superior a 12 horas é tido como "jejum prolongado" ou inanição.

Metabolismo no estado alimentado

A refeição estimula a liberação de insulina e inibe a secreção de glucagon

Os nutrientes presentes na refeição estimulam a liberação de insulina e suprimem a secreção de glucagon, afetando o metabolismo no fígado, tecido adiposo e músculo (Fig. 21.10). A utilização de glicose pelo cérebro permanece inalterada. Ocorre um aumento da captação de glicose nos tecidos dependentes de insulina, principalmente no músculo esquelético. A oxidação de glicose e a síntese de glicogênio são estimuladas, e a oxidação de lipídios é inibida. A glicose captada pelo fígado é fosforilada pela glicocinase, originando glicose-6-fosfato (Glc-6-P). O excesso de glicose é dirigido para a via dos fosfatos de pentose, gerando NADPH + H^+, utilizado em reações biossintéticas que requerem reduções, como a síntese de ácidos graxos e colesterol.

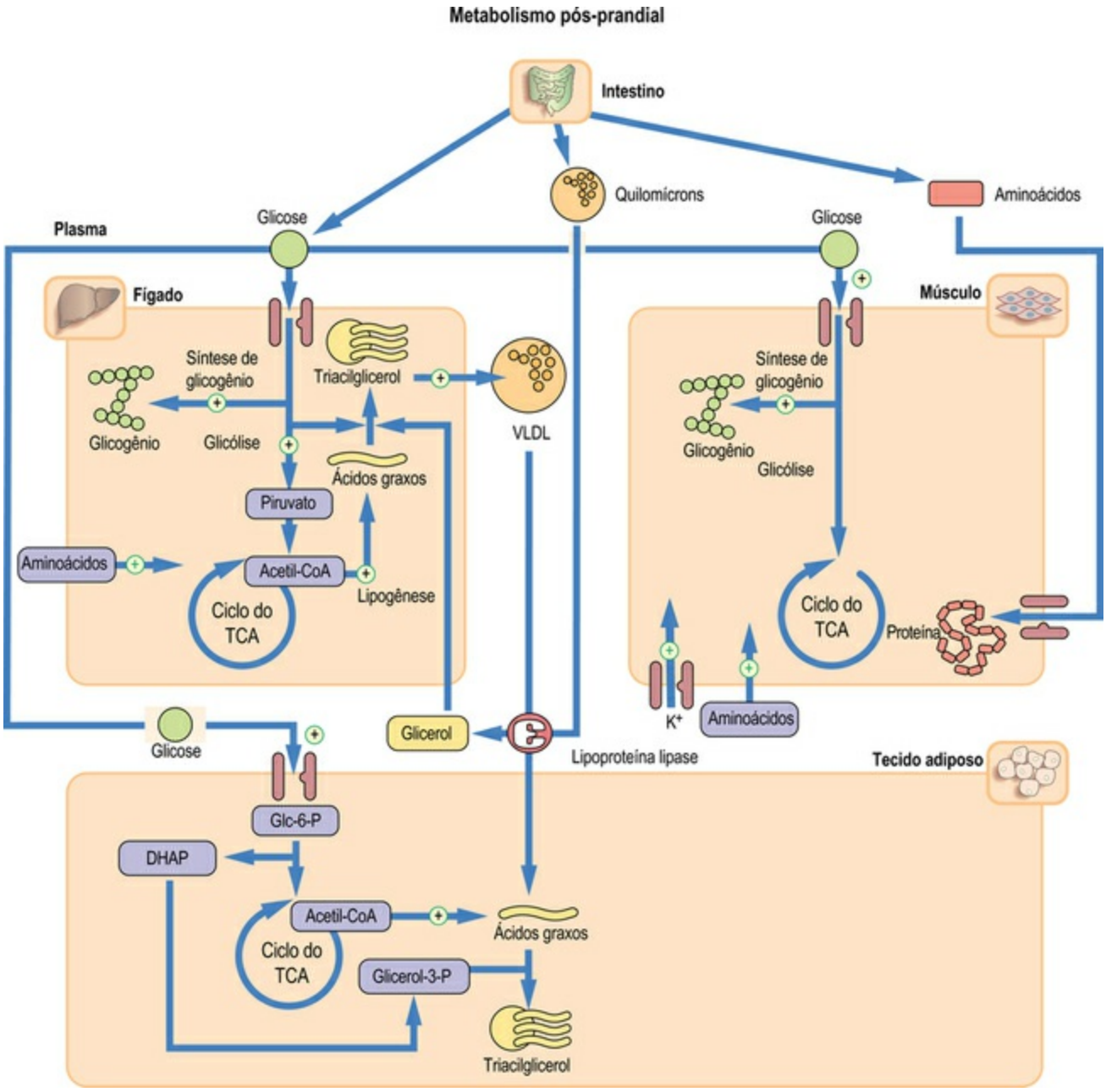


FIG. 21.10 Metabolismo no estado alimentado (pós-prandial). Carboidratos, aminoácidos e gorduras são absorvidos no intestino, e a secreção de insulina é estimulada. A insulina direciona o metabolismo no sentido de armazenamento e síntese (anabolismo). No fígado, a glicose é captada pelo transportador GLUT-2 e é canalizada para a glicólise e para a síntese de glicogênio. A glicólise aeróbica fornece acetil-CoA, que é um substrato fundamental para a síntese de ácidos graxos. Os ácidos graxos são então esterificados pelo glicerol derivado da glicólise, formando triacilgliceróis em um processo conhecido como lipogênese. Os triacilgliceróis são empacotados em VLDL para o transporte para os tecidos periféricos. No músculo, a síntese de glicogênio, a captação de aminoácidos e a síntese de proteínas são estimuladas. No tecido adiposo, os triacilgliceróis das VLDL são hidrolisados e os ácidos graxos são captados pelas células. Os triacilgliceróis são novamente sintetizados intracelularmente, tornando-se parte do material de armazenamento do adipócito. DHAP, di-hidroxiacetona fosfato; Glc-6-P, glicose-6-fosfato.

A gordura (triacilgliceróis) absorvida no intestino é transportada em quilomícrons para os tecidos periféricos, onde é hidrolizada em glicerol e ácidos graxos livres pela lipoproteína lipase (Cap. 18). Os ácidos graxos liberados são captados pelas células. No músculo, são utilizados como combustível. No tecido adiposo, são reorganizados em triacilgliceróis e armazenados. Essa reorganização em triacilgliceróis requer glicerol, que é obtido pela glicólise (pela redução das trioses fosfato em glicerol-3-fosfato). A insulina

estimula a síntese de ácidos graxos no fígado e tecido adiposo. Estimula também a captação de aminoácidos e a síntese proteica, e diminui a degradação de proteínas no fígado, músculo e tecido adiposo.

Metabolismo no estado de jejum

Durante o jejum o fígado passa de um órgão utilizador de glicose para um órgão produtor de glicose

Durante o jejum, a secreção de insulina diminui e a secreção de glucagon aumenta (Fig. 21.11). Isso leva à diminuição da síntese de glicogênio e ao aumento da glicogenólise. O fígado é transformado de um órgão utilizador de glicose a um órgão produtor de glicose. Após uma noite de jejum, é atingido um estado de equilíbrio, no qual a produção hepática de glicose se torna equivalente à sua captação periférica.

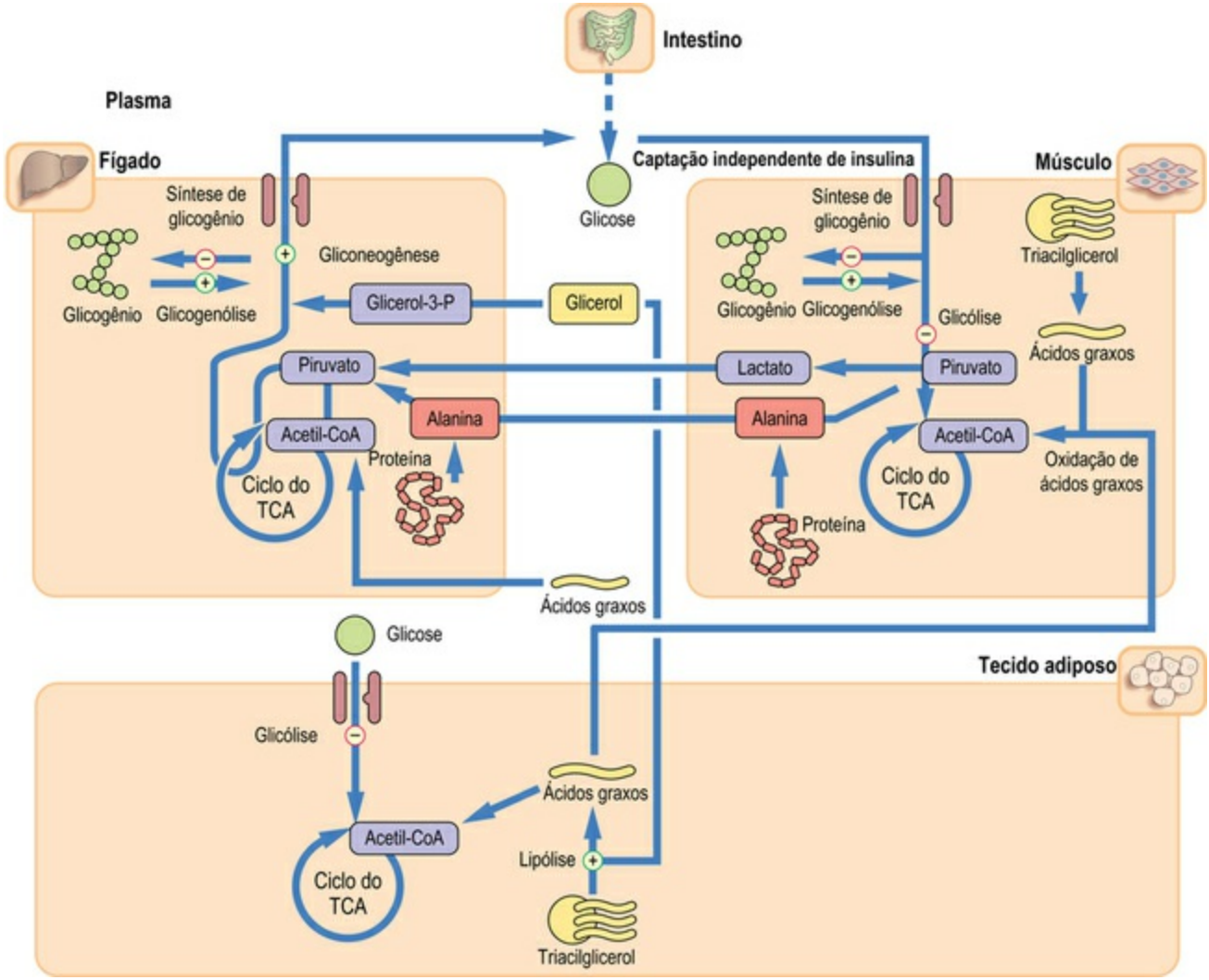


FIG. 21.11 Metabolismo após jejum de uma noite (estado pós-absortivo). No estado pós-absortivo, o metabolismo hepático deixa de utilizar glicose e passa a produzi-la (através da gliconeogênese estimulada pelo glucagon). O glucagon também estimula a glicogenólise e inibe a glicólise. Os substratos para a gliconeogênese são **a alanina, o lactato e o glicerol.** A alanina e o lactato são transportados do músculo para o fígado (Fig. 21.13). A captação de glicose pelo músculo e pelo tecido adiposo diminui. A degradação de triacilgliceróis (lipólise) e a subsequente oxidação de ácidos graxos são estimuladas, fornecendo energia.

Os três substratos-chave para a gliconeogênese são o lactato, a alanina e o glicerol

No estado de jejum os tecidos dependentes de insulina utilizam relativamente pouca glicose – o músculo e o tecido adiposo, em conjunto, utilizam apenas 20% de toda a glicose disponível. Até 80% da totalidade de glicose é captada por tecidos independentes de insulina. Dessa parcela, 50% é utilizada pelo cérebro e 20% pelos eritrócitos.

Após um jejum de 12 horas, 65-75% da glicose sintetizada é ainda derivada do glicogênio; a restante provém da gliconeogênese. Durante jejuns mais longos, a contribuição da gliconeogênese aumenta de forma constante. O músculo facilita a gliconeogênese ao liberar lactato, que é captado pelo fígado. O lactato é oxidado a piruvato, que entra na gliconeogênese. A nova glicose sintetizada é liberada pelo fígado e regressa ao músculo esquelético. Essa etapa encerra o círculo conhecido como **ciclo de Cori** (Fig. 21.12).

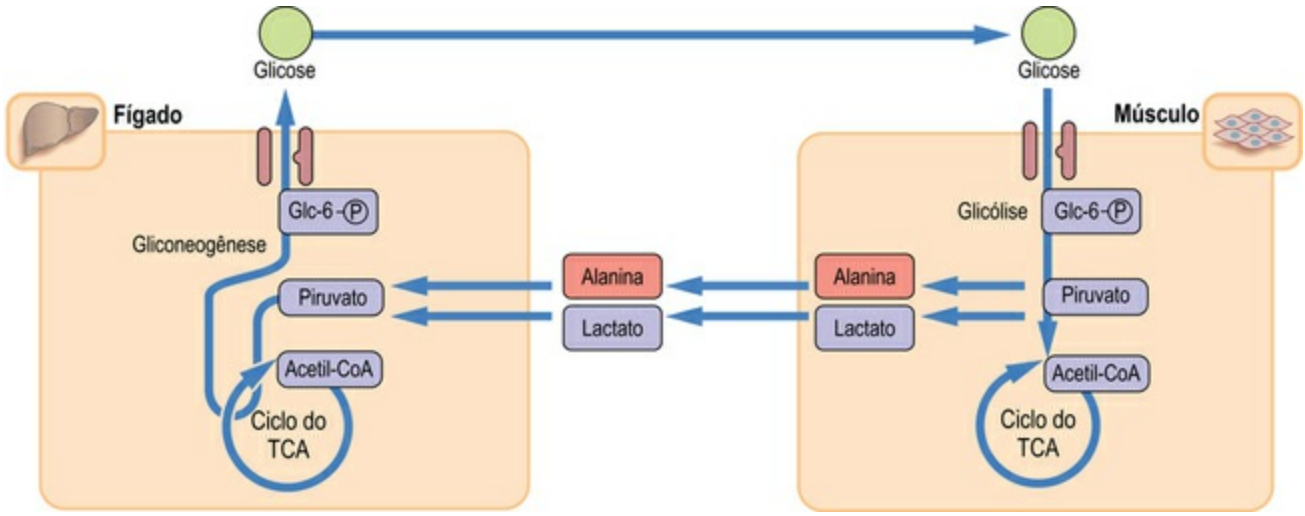


FIG. 21.12 Ciclo de Cori e ciclo da glicose-alanina. O ciclo de Cori (glicose–lactato) permite a reciclagem do lactato novamente em glicose. A alanina deriva maioritariamente da proteólise muscular.

A baixa concentração de insulina contribui para a liberação de aminoácidos (principalmente alanina e glutamina) do músculo através da estimulação da proteólise muscular. A alanina, analogamente ao lactato, é captada pelo fígado e convertida em piruvato. Este **ciclo glicose-alanina** é idêntico ao ciclo de Cori.

O terceiro substrato gliconeogênico, o glicerol, é liberado durante a hidrólise de triacilgliceróis pela lipase hormônio sensível (lipólise), um processo estimulado pelo glucagon. Os ácidos graxos liberados dos triacilgliceróis estimulam a cetogênese a partir de acetil-CoA. A cetogênese, por sua vez, gera acetoacetato, hidroxibutirato e o produto da descarboxilação espontânea do acetoacetato, a acetona (os produtos da cetogênese são coletivamente conhecidos como corpos cetônicos). Durante o jejum prolongado, os corpos cetônicos podem ser utilizados como substratos energéticos no coração, no músculo esquelético e também no cérebro.

Jejum prolongado

O jejum prolongado (inanição) é um estado crônico de baixa insulina e elevado glucagon. É também acompanhado por uma diminuição na concentração de hormônios tireoidianos, o que leva à diminuição da velocidade metabólica. Os ácidos graxos livres se tornam os principais substratos energéticos — a β oxidação de ácidos graxos gera acetil-CoA para ser utilizada no ciclo do TCA.

No entanto, como a gliconeogênese permanente esgota o oxaloacetato (o metabólito do ciclo do TCA), a atividade do ciclo do TCA (Cap. 14) diminui. Assim, vai haver acumulação de acetil-CoA, que vai ser canalizada para a cetogênese. Consequentemente, durante o jejum prolongado, a concentração plasmática de corpos cetônicos aumenta.

Adicionalmente, existem mecanismos que protegem as proteínas do organismo durante o jejum prolongado, ao diminuírem a necessidade de produção endógena de glicose.

A utilização de proteínas como substrato para a gliconeogênese é minimizada por uma dependência quase total da gordura como fonte de energia (Fig. 21.13). O ciclo de Cori

também diminui a necessidade de glicose endógena. Adicionalmente, a quantidade do transportador GLUT-4 no tecido adiposo e no músculo diminui, diminuindo a captação celular de glicose e "poupando", assim, ainda mais glicose. Possivelmente, o cérebro também se adapta à utilização de corpos cetônicos como combustível. Algum tecido cerebral, na verdade, muda da completa oxidação da glicose para a glicólise.

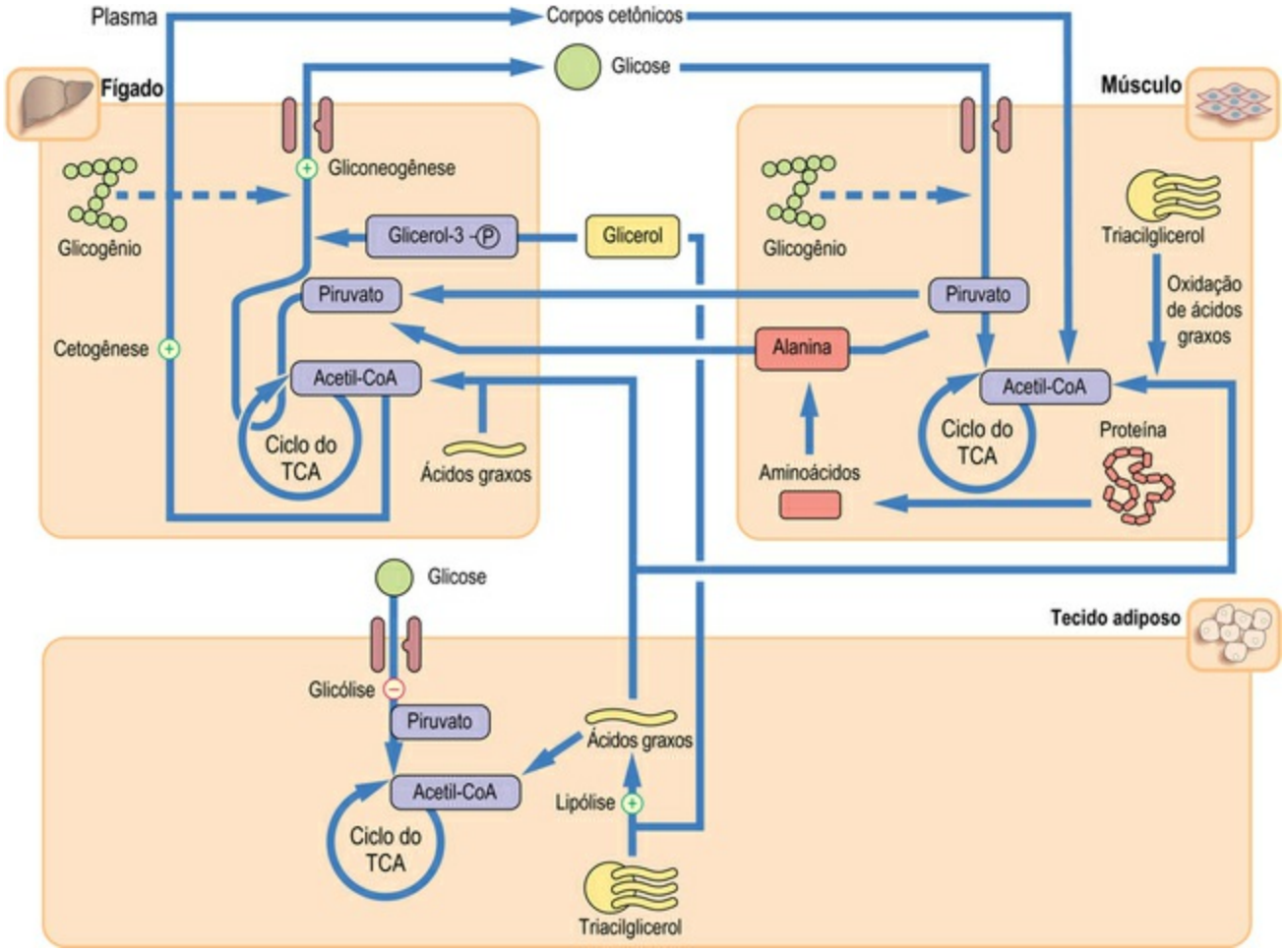


FIG. 21.13 Metabolismo durante o jejum prolongado (inanição). O estado catabólico é similar ao do jejum mediano de curta duração, mas existem respostas adaptativas em ação. Nesta fase as reservas de glicogênio estão esgotadas, e o fornecimento de combustíveis metabólicos depende da gliconeogênese e da lipólise. Os corpos cetônicos produzidos a partir de grandes quantidades de acetil-CoA, formada na oxidação de ácidos graxos, tornam-se uma importante fonte de energia para o músculo. O cérebro também se adapta à sua utilização. De forma importante, a diminuição da necessidade de glicose (e, portanto, da gliconeogênese) por sua vez diminui a necessidade de alanina, "poupando" as proteínas musculares.

Metabolismo durante o estresse

A resposta ao estresse é dirigida pelos hormônios anti-insulínicos

A resposta ao estresse não ocorre apenas em situações de "luta e fuga", mas é também desencadeada por **traumas, queimaduras, cirurgias e infecções:** desse modo a resposta ao estresse é substancialmente importante na medicina. Geralmente se associa a hipermetabolismo e à atividade aumentada do sistema nervoso simpático. A resposta

metabólica é dirigida pelos hormônios anti-insulínicos: as catecolaminas, principalmente a epinefrina (Fig. 13.5), o glucagon e o cortisol. As vias anabólicas (síntese de glicogênio, lipogênese) são suprimidas e as vias catabólicas (glicogenólise, lipólise e proteólise) são estimuladas. A captação periférica de glicose independente de insulina aumenta (Fig. 21.14). Clinicamente, ocorre uma vasoconstrição precoce que visa limitar uma possível perda sanguínea. Ocorre ainda febre, taquicardia, taquipneia (frequência respiratória aumentada) e leucocitose.

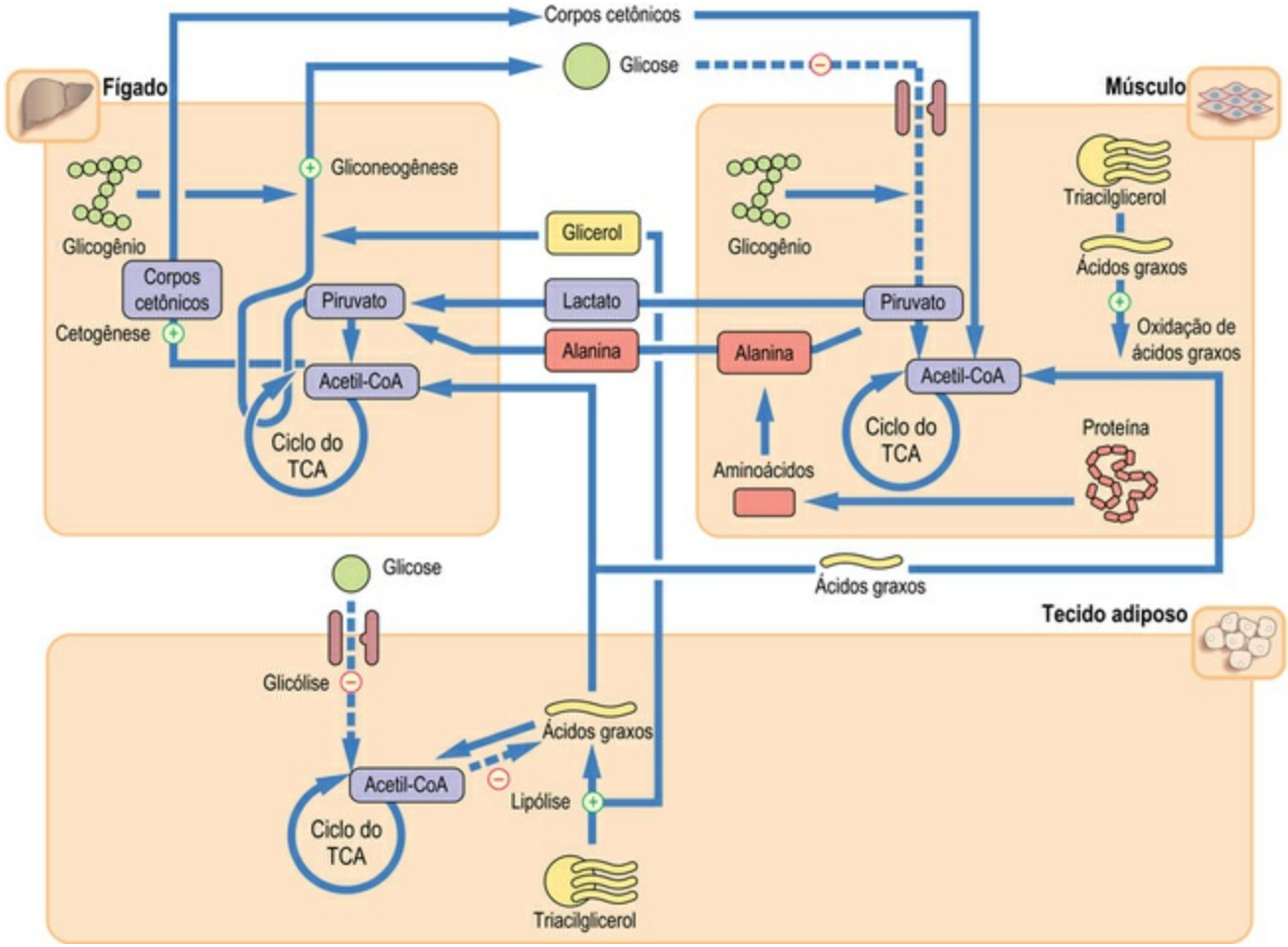


FIG. 21.14 Metabolismo durante o estresse e a lesão. A resposta metabólica é catabólica, e é, *grosso modo,* análoga ao jejum. A glicose é mobilizada de todas as fontes disponíveis. No entanto aqui a epinefrina tem um papel determinante e, juntamente com o glucagon, inibe a secreção de insulina. O estresse também induz resistência periférica à insulina, poupando glicose. A energia é fornecida pela glicose, pelos ácidos graxos e pelo catabolismo de proteínas.

A resposta ao estresse mobiliza substratos energéticos de todas as fontes disponíveis

A prioridade é fornecer glicose ao cérebro: a epinefrina e o glucagon estimulam a glicogenólise e a gliconeogênese. Além disso, a diminuição da captação periférica de glicose torna-a mais disponível para o cérebro. Posteriormente, a velocidade do metabolismo aumenta e os ácidos graxos se tornam a principal fonte de energia. Os aminoácidos para a gliconeogênese são fornecidos pelo músculo; isso leva a um balanço negativo de nitrogênio após 2-3 dias da lesão.

A resposta ao estresse inclui resistência à insulina

O transporte de glicose dependente de insulina para as células, mediado pelo GLUT-4, diminui sob a influência de glicocorticoides. Além disso, os glicocorticoides, ao induzirem os genes que codificam a Glc-6-Pase e a PEPCK, facilitam a estimulação da gliconeogênese pelo glucagon e pelas catecolaminas (Tabela 21.3). A captação de glicose independente de insulina aumenta, particularmente no músculo. Este aumento é mediado pelo fator de necrose tumoral α (TNF-α) e por citocinas como a interleucina-1 (IL-1) (Cap. 42). O TNF-α também estimula a quebra do glicogênio muscular. A IL-6 auxilia na indução da PEPCK, estimula a lipólise no tecido adiposo e contribui para a proteólise muscular. Ocorre um aumento na produção de lactato.

A resposta ao estresse afeta o resultado de testes laboratoriais

A resposta metabólica ao estresse afeta o resultado de análises laboratoriais comuns. O achado principal é a hiperglicemia; é de salientar que, durante o estresse, a presença de hiperglicemia não deve ser confundida com diabetes melito. Lesões, infecções e traumas estão associados a uma resposta de fase aguda, que estimula a síntese de uma variedade de proteínas, como a α_1-antitripsina, a proteína C reativa (CRP), a haptoglobina, a α_1-glicoproteína ácida, as proteínas do complemento, entre outras. Por outro lado, a síntese de albumina é suprimida. A análise dos níveis de CRP é essencial na monitorização do tratamento em pacientes com infecções graves (Cap. 4).

Diabetes melito

De acordo com a Federação Internacional de Diabetes (dados de 2012) existem 371 milhões de pessoas com diabetes no mundo (esse número inclui o número estimado de casos não diagnosticados). A prevalência de diabetes está a aumentar. Em 1985 existiam 80 milhões de indivíduos diabéticos, e prevê-se que aumente para 430 milhões em 2030 (Tuchman, em "Leituras Sugeridas"). Esse aumento está ligado a estilos de vida que incluem alimentos de elevado conteúdo energético e pouco exercício físico — e ao aumento da prevalência de obesidade. O diabetes resulta do efeito combinado de influências genéticas e ambientais. Por outras palavras, os efeitos ambientais e o estilo de vida provavelmente vão causar diabetes em indivíduos geneticamente (e epigeneticamente, ver Cap. 36) suscetíveis. Até o momento, mais de 40 *loci* foram associados exclusivamente ao diabetes tipo 2: no entanto, apenas cerca de 10% da herdabilidade do diabetes pode ser explicada por estes *loci*.

O diabetes é uma doença do metabolismo energético caracterizada por hiperglicemia e (mais tarde) lesão vascular

Existem dois principais componentes da síndrome do diabetes melito: a hiperglicemia e as complicações vasculares. Existem **quatro formas principais de diabetes melito:** diabetes tipo 1 (T1D), diabetes tipo 2 (T2D), diabetes secundário e diabetes gestacional (GDM, diabetes da gravidez).

A forma mais comum é o T2D: 90% de todos os pacientes diabéticos têm T2D e 5-10%

têm T1D. Comparativamente, as outras duas formas são raras. O diabetes tem um componente genético forte, mas é frequentemente revelado por fatores relacionados com o estilo de vida. Alguns pacientes diabéticos são completamente assintomáticos. Nesses indivíduos, o diagnóstico é feito apenas com base em resultados laboratoriais – daí a importância dos testes laboratoriais (Tabela 21.4).

Tabela 21.4

Classificação do diabetes melito

Síndrome	Comentário
Tipo 1	Destruição autoimune das células β
Tipo 2	Comprometimento das células β: incapacidade da célula β em compensar a resistência à insulina
Outros tipos	Defeitos genéticos das células β (p. ex., mutações do gene da glicocinase). Síndromes raras de resistência à insulina
	Doenças do pâncreas exócrino. Doenças endócrinas (acromegalia, síndrome de Cushing). Diabetes induzido por fármacos ou químicos, infecções (p. ex., papeira)
	Síndromes raras caracterizadas pela presença de anticorpos antirreceptor. Diabetes associado a outras doenças genéticas (p. ex., síndrome de Down)
Diabetes gestacional	Qualquer grau de intolerância à glicose diagnosticado na gravidez

O diabetes tipo 1 era descrito anteriormente como diabetes insulinodependente (IDDM) e o diabetes tipo 2 como diabetes não insulinodependente (NIDDM) ou diabetes do adulto.



Quadro clínico

Uma mulher com dor torácica e concentração plasmática de glicose elevada: hiperglicemia induzida pelo estresse

Uma mulher de 66 anos foi admitida na enfermaria de cardiologia com dor no peito. Foi diagnosticado infarto do miocárdio com base no eletrocardiograma e no aumento da concentração plasmática de troponina. Foi tratada com sucesso por meio de trombólise. À entrada, o nível de glicose plasmática ocasional era de 10,5 mmol/L (189 mg/dL). No dia seguinte, a glicemia em jejum estava apenas ligeiramente elevada a 7,5 mmol/L (117 mg/dL). A glicose plasmática em jejum normal é de 4,0-6,0 mmol/L (72-109 mg/dL).

Comentário

O estresse intenso associado ao infarto do miocárdio está relacionado com a resposta dos hormônios contrarreguladores, o que vai levar à elevação da concentração de glicose sanguínea. É necessário cuidado na interpretação dos níveis de glicose em jejum no contexto de uma doença aguda. Testes de tolerância à glicose não devem ser realizados durante a doença aguda.

A longo prazo, o diabetes leva a alterações nas paredes das artérias de pequeno **(microangiopatia)** e grande **(macroangiopatia)** calibre. A microangiopatia que ocorre no rim (nefropatia diabética) pode levar à insuficiência renal (Quadro na p329). A microangiopatia que se desenvolve na retina (retinopatia diabética) pode causar cegueira, e a que ocorre no sistema nervoso (neuropatia diabética) leva ao comprometimento da função do sistema nervoso autônomo. Os pacientes diabéticos desenvolvem também opacificações do cristalino (cataratas). O diabetes é a principal causa de cegueira no mundo ocidental e uma das principais causas de insuficiência renal.

A macroangiopatia diabética está associada a um risco 2-3 vezes superior de infarto do miocárdio relativamente a pessoas não diabéticas da mesma idade. A macroangiopatia, ao afetar as artérias periféricas, leva à doença vascular periférica diabética e à ulceração dos pés: o diabetes continua a ser uma das principais causas de amputações do membro inferior. No entanto, a complicação mais prevalente do diabetes é a doença cardiovascular, que é a causa de morte em mais de 80% dos pacientes com diabetes tipo 2.

Diabetes tipo 1

O diabetes tipo 1 é uma doença autoimune

O T1D se desenvolve geralmente em pessoas abaixo dos 35 anos, com pico de incidência por volta dos 12 anos. No entanto, esse padrão parece estar mudando: dados mais recentes sugerem que atualmente apenas 50-60% dos pacientes têm menos de 16-18 anos no momento de apresentação da doença. O T1D é causado pela destruição autoimune das células β pancreáticas. Sua causa precipitante permanece desconhecida; poderá ser uma infecção viral (p. ex., rubéola congênita), toxinas ambientais ou alimentos. A reação autoimune pode ser iniciada pela resposta de citocinas à infecção.

A suscetibilidade ao diabetes tipo 1 é herdada

A taxa de concordância para o T1D em gêmeos monozigóticos é de 30-40%. O risco de diabetes é maior se houver história paterna (em comparação com história materna) da doença. Os genes de suscetibilidade estão localizados no cromossomo 6 no complexo principal de histocompatibilidade (MHC; Cap. 38). Aproximadamente 50% da suscetibilidade gênica para o diabetes reside nos genes HLA: nos genótipos HLA DR e DQ, e em menor extensão em outros *loci*, conhecidos como IDDM2 (insulina-VNTR) e IDDM12 (CTLA-4). Tanto os genes que comportam risco (DR3/4, DQA1*0301-DQB1*0302 e DQA1*0501-DQB1*0201) quanto os que concedem proteção (DQA1*0102-DQB1*0602) foram identificados no complexo HLA. Curiosamente, essa região também contém genes de suscetibilidade associados a outras doenças autoimunes; isto significa que pacientes com diabetes tipo 1 são mais suscetíveis a outras doenças autoimunes, como a doença de Graves, a doença de Addison e a doença celíaca.

Além da infiltração inflamatória das ilhotas pancreáticas, resultante de uma resposta anormal das células T (Cap. 38), uma porcentagem de pacientes apresenta uma resposta

anormal das células B com anticorpos circulantes contra várias proteínas das células β. Os autoanticorpos podem aparecer anos antes do diagnóstico e podem ser dirigidos contra a insulina, a descarboxilase do ácido glutâmico (GAD) e a proteína tirosina fosfatase, ou contra antígenos das ilhotas.

Indivíduos com T1D são propensos ao desenvolvimento de cetoacidose e são dependentes do tratamento com insulina. O desenvolvimento de doença sintomática pode acontecer rapidamente, e a cetoacidose pode estar presente no momento do diagnóstico.

Diabetes tipo 2

O comprometimento da função das células β é o principal fator no desenvolvimento de diabetes tipo 2

O T2D se desenvolve normalmente em indivíduos obesos com mais de 40 anos. No entanto, nos últimos anos, o diabetes tem sido cada vez mais observado em pacientes mais novos. Há muito que se discute qual dos dois principais fatores contributivos é dominante: o comprometimento da função das células β pancreáticas (e consequentemente da secreção de insulina) ou a resistência periférica à insulina. Interpretações recentes favorecem o primeiro fator. A maioria dos genes de suscetibilidade para o diabetes descoberta está ligada à secreção de insulina e à função das células β. Assim, a incapacidade da célula β em lidar com o fornecimento excessivo de nutrientes e em compensar a resistência à insulina existente é o principal fator que leva ao desenvolvimento de diabetes. Existe também uma perturbação mais ampla do sistema homeostático da glicose. Essa perturbação inclui a secreção aumentada de glucagon, uma resposta reduzida das incretinas e também a secreção diminuída de adiponectina e a inflamação no tecido adiposo.

A obesidade é um fator de risco-chave para o diabetes tipo 2

Os dois fatores de risco mais importantes para o T2D são a história familiar e a obesidade. A obesidade, por sua vez, está fortemente ligada à resistência à insulina.

A resistência à insulina se apresenta inicialmente como hiperinsulinemia com concentração de glicose normal — um sinal de que as células β compensam de forma eficaz a resistência periférica à insulina. Quando essa compensação falha, a concentração plasmática de glicose pode aumentar ligeiramente em jejum (condição conhecida como anomalia da glicemia em jejum, IFG) ou em resposta a uma carga de glicose (diminuição da tolerância à glicose, IGT). Tanto a IFG quanto a IGT são preditores de diabetes. A IGT está também associada a um risco aumentado de complicações macrovasculares. Um aumento adicional na resistência à insulina e a consequente deficiência da secreção de insulina levam à T2D clinicamente evidente. É de salientar que a deterioração da tolerância à glicose pode ser abrandada ou, ocasionalmente, revertida através da redução de peso e da realização de exercício. Assim, a IFG e a IGT são sinais de alerta para que os indivíduos alterem seus estilos de vida, minimizando a hipótese de desenvolverem

diabetes posteriormente.

A herdabilidade do diabetes tipo 2 é superior a 50%

Gêmeos monozigóticos são aproximadamente 70% concordantes no que diz respeito ao T2D, e a concordância em gêmeos dizigóticos é de 20-30%. Parentes de primeiro grau de indivíduos diabéticos têm uma probabilidade de 40% de desenvolver a doença.

Estudos populacionais identificaram seis genes associados à T2D. Nestes está incluído o gene que codifica o receptor ativado por proliferador de peroxissoma gamma (PPAR-γ). Outro gene (IRS1) codifica o IRS-1 e está associado a um comprometimento da resposta periférica à insulina. O gene que codifica o canal de potássio retificador de influxo, subfamília J, membro 11 (KCNJ11) afeta a secreção de insulina: esse gene codifica duas proteínas que constituem um canal de potássio sensível a ATP, que regula a secreção de insulina dependente de glicose nas células β. Sua mutação causa uma forma rara de diabetes neonatal. O gene WFS1 codifica a wolframina, uma proteína detectada em pacientes com uma síndrome que inclui diabetes insípido e diabetes juvenil, bem como surdez e atrofia óptica. Finalmente, os genes que codificam o HNF1 *homeobox* A (HNF1A) e o HNF1 *homeobox* B (HNF1B) estão associados a formas de diabetes monogênica (MODY, a seguir).

Em 2007 um estudo de associação genômica ampla (*genome-wide association studies*, GWAS) identificou dois genes adicionais associados à T2D, sendo o mais importante o gene do transportador de solutos família 30, membro 8 (SLC20A8) — um gene que, de forma algo surpreendente, codifica um transportador de zinco. Outro gene identificado foi o gene *homeobox* de expressão hematopoiética HHEX. Genes de suscetibilidade adicionais foram ainda identificados por amplas meta-análises subsequentes aos GWAS. Esses genes estão também associados à secreção de insulina, como o MTNR1B (receptor da melatonina), que está associado ao comprometimento da primeira fase da secreção de insulina. Os outros genes identificados, como o GCKR e o IGF1, estão associados à resistência à insulina. Os genes associados à obesidade, como o FTO (Cap. 22), estão também relacionados com a T2D.

O diabetes do adulto com início na juventude (MODY) é uma forma rara de diabetes tipo 2

O MODY se desenvolve antes dos 25 anos e é caracterizado pela secreção persistente de peptídio C e por um padrão claro de herdabilidade. O MODY resulta de mutações em pelo menos seis genes diferentes; entre eles está o gene que codifica a glicocinase (afetando a sensibilidade da célula β à glicose e causando o MODY2); o gene que codifica o fator de transcrição HNF1A, que causa o MODY3; e o gene do HNF1B, que causa o MODY5. Existe também uma mutação no DNA mitocondrial que leva ao comprometimento da fosforilação oxidativa e causa o chamado diabetes mitocondrial.

Os genes associados ao MODY proporcionam uma compreensão fascinante acerca da determinação genética da resposta ao tratamento. Ao contrário dos tipos de MODY causados por mutações em fatores de transcrição, o MODY2 responde à dieta, e estes pacientes não necessitam de insulina. Pacientes com mutações no HFN1A respondem às

sulfonilureias.

Um *continuum* entre diabetes do tipo 1 e do tipo 2?

Aproximadamente 10% dos pacientes diagnosticados com T2D têm igualmente autoanticorpos contra a descarboxilase do ácido glutâmico; estes são, na verdade, indivíduos que estão desenvolvendo uma forma de T1D, por vezes chamada de diabetes latente autoimune do adulto (LADA).

A hipótese do acelerador (desenvolvida por Wilkin) propõe que existem três "aceleradores" principais do diabetes: o potencial para apoptose das células β, a resistência à insulina e a predisposição à imunidade das células β. Se os três estiverem presentes, desenvolve-se o T1D. Se a predisposição à autoimunidade estiver ausente, desenvolve-se o T2D.

No diabetes tipo 2 a cetoacidose é rara

Pacientes com T2D podem desenvolver complicações microvasculares de forma idêntica ao T1D, mas o principal problema são as complicações macrovasculares, que possivelmente levam a doença cardíaca coronária, doença vascular periférica e acidente vascular cerebral. O T1D e o T2D são comparados na Tabela 21.5.

Tabela 21.5

Comparação entre o diabetes tipo 1 e tipo 2

	Tipo 1	Tipo 2
Início	Geralmente antes dos 20 anos	Geralmente depois dos 40 anos
Síntese de insulina	Ausente: destruição imune das células β	Preservada: combinação de resistência à insulina com a função comprometida da célula β
Concentração plasmática de insulina	Baixa ou ausente	Baixa, normal ou elevada
Suscetibilidade genética	Sim	Sim
Anticorpos contra as células das ilhotas no momento do diagnóstico	Sim	Não
Obesidade	Incomum	Comum
Cetoacidose	Sim	Rara – pode ser precipitada por grande estresse metabólico
Tratamento	Insulina	Fármacos hipoglicemiantes e insulina

Metabolismo no diabetes

No diabetes tipo 1, a glicose não pode entrar em células dependentes de insulina, como os adipócitos e os miócitos, devido à carência de insulina

A carência de insulina significa que o metabolismo, por defeito, entra em um modo

controlado pelo glucagon. A glicólise e a lipogênese são inibidas, ao passo que a glicogenólise, a lipólise, a cetogênese e a gliconeogênese são estimuladas pelo glucagon (Fig. 21.15). O fígado se transforma em um órgão produtor de glicose. Isso, combinado com o transporte comprometido de glicose para as células, leva à hiperglicemia em jejum.

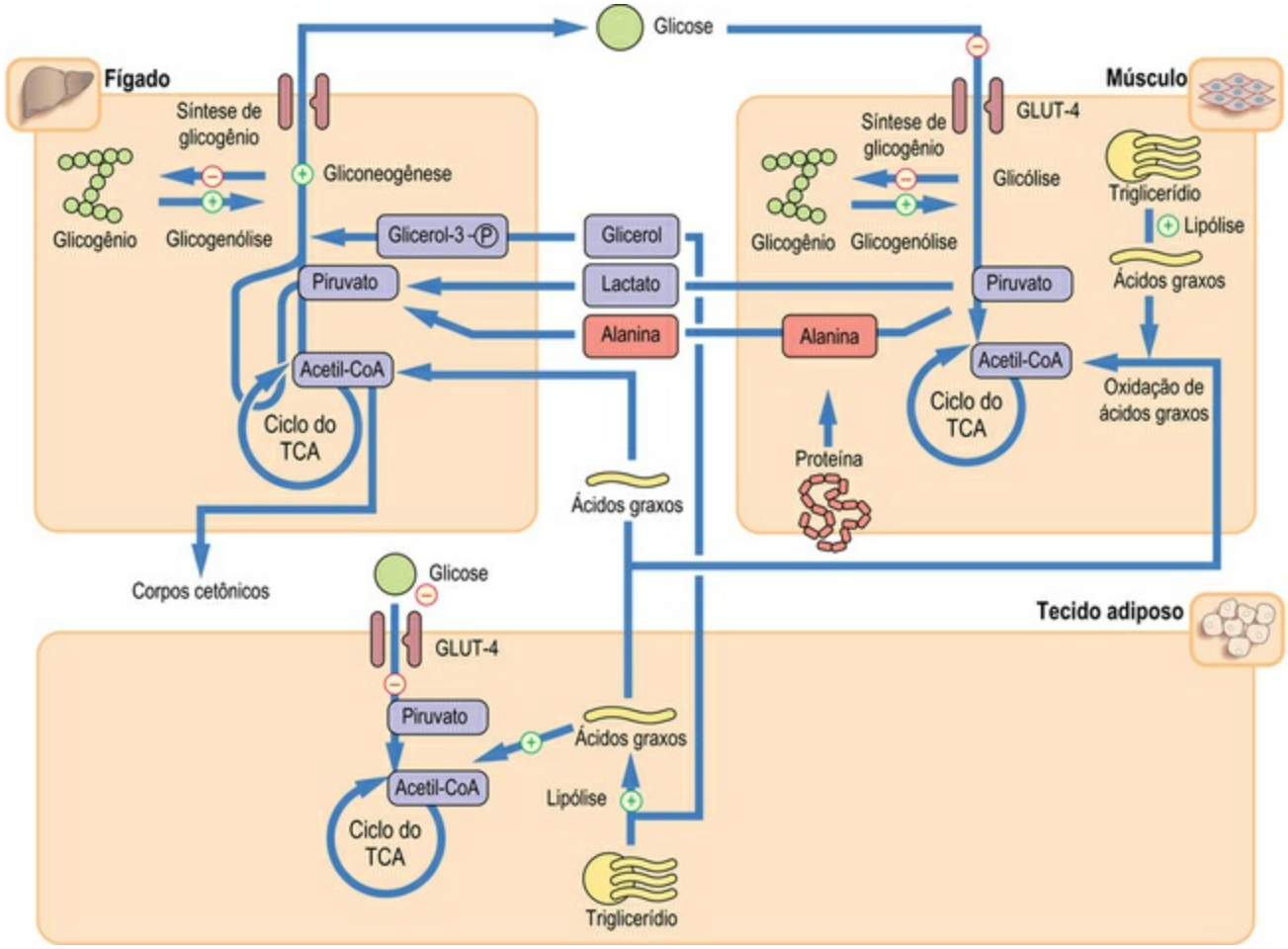


FIG. 21.15 Metabolismo no diabetes melito. No diabetes há uma capacidade diminuída dos tecidos para utilizarem glicose devido à falta de insulina ou à ação defeituosa da insulina, ou ambos. A hiperglicemia é causada pelo efeito combinado de diminuição da captação periférica de glicose e do aumento da gliconeogênese hepática. O excesso de ácidos graxos disponíveis para o fígado, em conjunto com o ciclo do TCA menos eficiente devido à utilização do oxaloacetato para a gliconeogênese, resulta na acumulação de acetil-CoA e na sua conversão em corpos cetônicos.

Quando a concentração plasmática de glicose excede a capacidade de reabsorção renal, a glicose aparece na urina. Como a glicose é osmoticamente ativa, sua excreção é acompanhada por um aumento da perda de água (a diurese osmótica). Pacientes diabéticos mal controlados excretam grandes quantidades de urina (poliúria) e bebem quantidades excessivas de fluidos (polidipsia). A perda de fluidos eventualmente leva à desidratação (Cap. 23). Paralelamente à perturbação do balanço hídrico, a lipólise gera um excesso de acetil-CoA, que entra na cetogênese. A concentração plasmática de corpos cetônicos aumenta (cetonemia) e estes são excretados na urina (cetonúria). A sobreprodução de ácido acetoacético e β-hidroxibutírico aumenta a concentração sanguínea de íons de hidrogênio (diminuindo o pH sanguíneo). Essa forma de acidose metabólica (Cap. 24) é conhecida como cetoacidose diabética (Fig. 21.16). Em alguns

pacientes, a acetona pode ser notada no hálito.

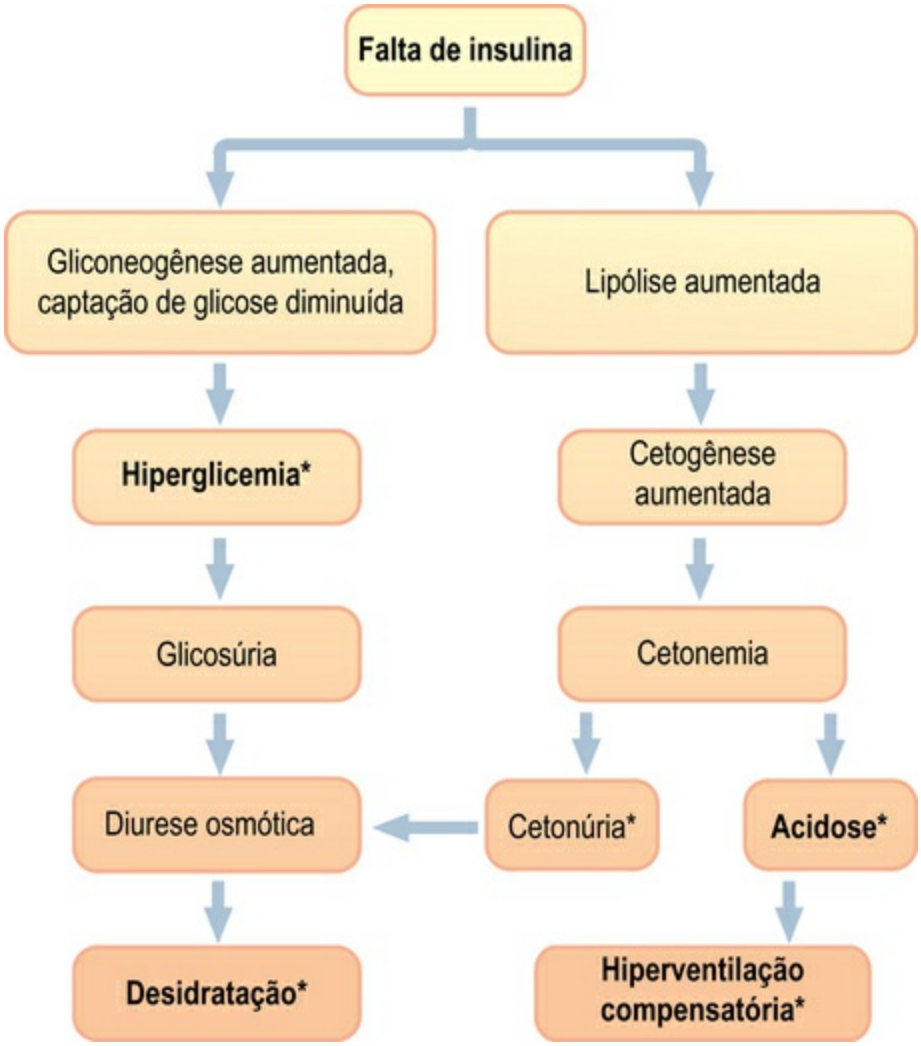


FIG. 21.16 Cetoacidose diabética. A apresentação clínica da cetoacidose é consequência da falta de insulina e da hiperglicemia resultante e suas complicações (diurese osmótica, desidratação), assim como do aumento da lipólise e da cetogênese (cetonemia e acidose). O tratamento da cetoacidose é dirigido para corrigir esses problemas e inclui infusão de insulina, reidratação e suplementação de potássio. *Indica os achados clínicos e laboratoriais mais importantes.

A cetoacidose é a principal complicação aguda do diabetes mal controlado

As características fundamentais da cetoacidose diabética são a hiperglicemia, a cetonúria, a desidratação e a acidose metabólica. A cetoacidose metabólica pode desenvolver-se rapidamente, por vezes após a ausência de uma só dose de insulina. A cetoacidose se desenvolve predominantemente em pessoas com T1D que não têm, ou têm pouca, insulina no plasma e, consequentemente, uma razão insulina/glucagon muito baixa. A cetoacidose é rara na T2D, apesar de poder ocorrer após um estresse maior, como o infarto do miocárdio. A cetoacidose não tratada é potencialmente fatal.

Note que existem semelhanças substanciais entre o metabolismo no estado de jejum e no diabetes; essa é a razão pela qual o diabetes foi descrito como "fome em meio de abundância". No entanto, enquanto o jejum leva apenas a uma cetonemia moderada, no diabetes existe acumulação de grandes quantidades de corpos cetônicos.

Quadro clínico

Uma menina de 15 anos admitida com confusão e hálito de acetona: cetoacidose diabética

Uma menina de 15 anos, sem história prévia de diabetes conhecida, foi admitida no serviço de urgência. Encontrava-se confusa e tinha o hálito com odor de acetona. Apresentava sinais de desidratação com redução do turgor cutâneo e língua seca. Apresentava ainda respiração rápida e sem pausas. A glicemia era de 18,0 mmol/L (324 mg/dL) e estavam presentes cetonas na urina. A concentração sérica de potássio era de 4,9 mmol/L (normal: 3,5-5,0 mmol/L) e o pH do sangue arterial era de 7,20 (normal: 7,37-7,44) (concentração de H^+ 63 nmol/L; normal: 35-45).

Comentário

Esta é a apresentação típica (se não provável neste caso) de cetoacidose diabética. A hiperventilação é uma resposta compensatória para a acidose (Cap. 24). A cetoacidose diabética é uma emergência médica. A paciente recebeu infusão intravenosa de solução salina fisiológica com suplemento de potássio para repor a perda de fluidos, e uma infusão de insulina. Observe que uma proporção substancial de crianças se apresenta com cetoacidose no momento do diagnóstico.

O diabetes, a obesidade e a hipertensão estão associados à doença cardiovascular

A obesidade, a resistência à insulina e a intolerância à glicose (ou diabetes) podem ser acompanhadas por dislipidemia (Cap. 18) e hipertensão arterial. Esse conjunto de condições foi descrito como síndrome metabólica. Essa síndrome está associada à inflamação de baixo grau ao nível da vasculatura (Cap. 18) e a uma tendência aumentada para a trombose (o estado hipercoagulável; Cap. 7). Mais importante é o fato de essa síndrome comportar um risco aumentado de doença cardiovascular.

A "síndrome metabólica" é um conceito criado para aumentar a conscientização dos clínicos sobre os múltiplos fatores de risco para a doença cardiovascular quando presentes em um mesmo indivíduo. A procura de um possível denominador comum entre os principais fatores de risco continua. Existe a percepção crescente de que o diabetes melito e a doença cardiovascular podem ter o que alguns investigadores chamam de "terreno comum". As várias relações entre obesidade, diabetes e aterosclerose estão ilustradas na Figura 21.17.

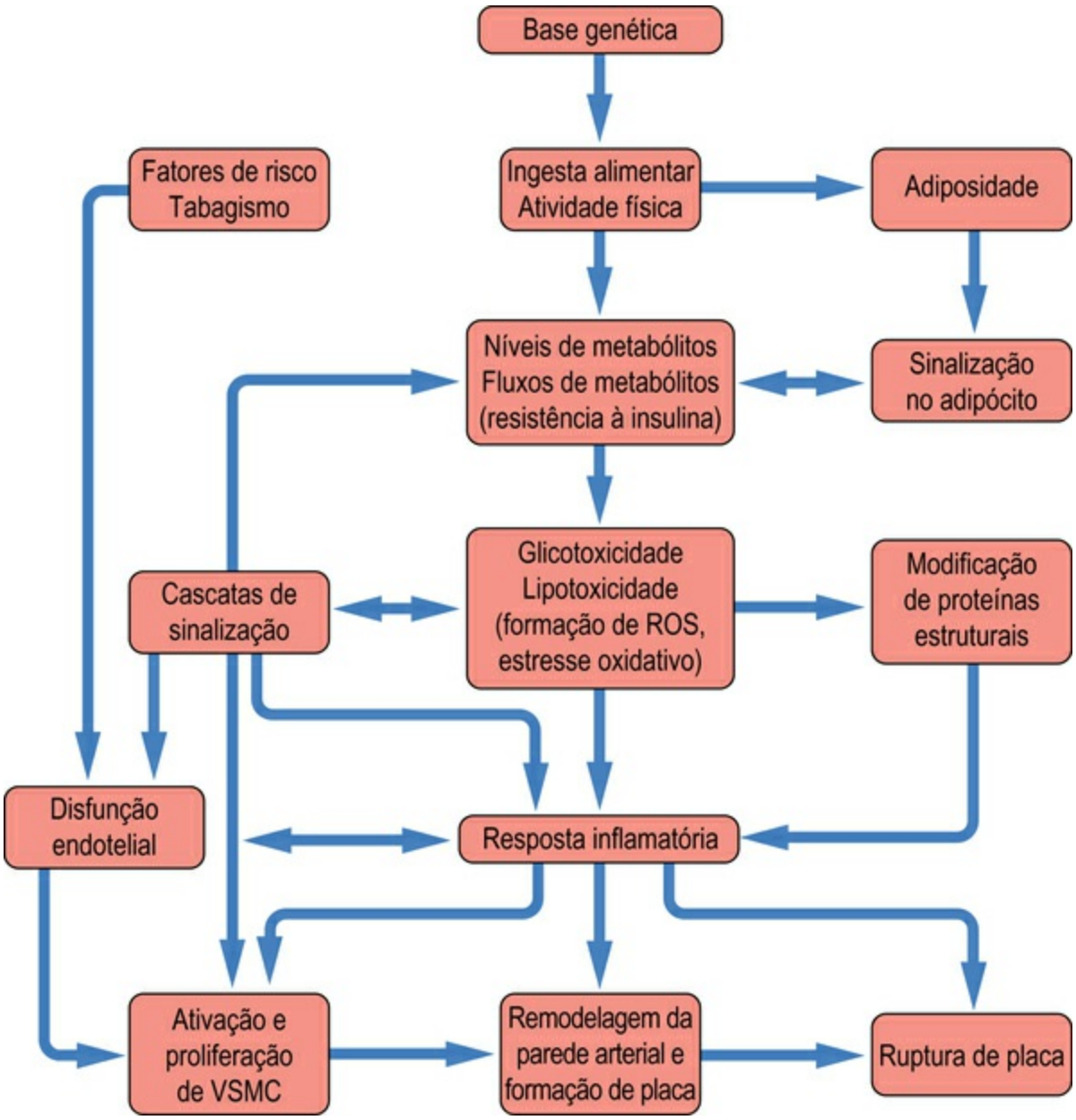


FIG. 21.17 Relações entre obesidade, intolerância à glicose, diabetes e aterosclerose. Na obesidade, a atividade endócrina do tecido adiposo é importante no desenvolvimento da resistência à insulina, da intolerância à glicose e do diabetes tipo 2. A inflamação de baixo grau e o estresse oxidativo aumentado podem ser induzidos tanto pela obesidade como pelos fatores de risco cardiovasculares clássicos. Isso resulta em lesão endotelial. Uma vez que o diabetes esteja presente, a glicação de proteínas e a formação dos produtos finais da glicação avançada (glicoxidação) contribuem ainda mais para a lesão vascular. VSMC, *vascular smooth muscle cell*.

Complicações vasculares do diabetes melito

O estresse oxidativo, os produtos finais da glicação avançada (glicoxidação) e a atividade da via do poliol contribuem para o desenvolvimento de complicações vasculares

A glicose em excesso é tóxica. Em presença de metais de transição como o cobre, a glicose sofre auto-oxidação. Essa auto-oxidação gera espécies reativas de oxigênio (ROS, Cap. 37). A glicose se liga também de forma não enzimática a resíduos de lisina e de valina em proteínas teciduais e plasmáticas, em um processo conhecido como glicação proteica

(Fig. 21.18). Quando a glicose interage com uma proteína, forma primariamente um composto lábil conhecido como base de Schiff. Esse, através do chamado rearranjo de Amadori, transforma-se espontaneamente em cetoamina. O produto de Amadori mais amplamente estudado é a **hemoglobina glicada** (hemoglobina A_{1c}, HbA_{1c}). Outras proteínas como a albumina, o colágeno e a apolipoproteína B sofrem igualmente glicação. A glicação afeta as funções das proteínas: tal como a sua ligação a receptores de membrana. Por exemplo, a glicação da apolipoproteína B inibe a captação celular de partículas de LDL.

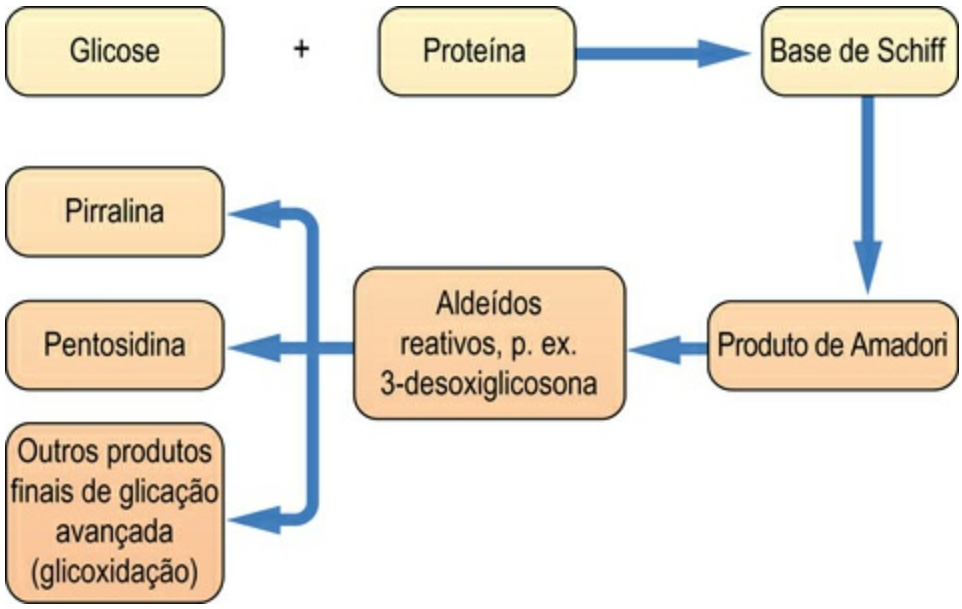


FIG. 21.18 Modificação de proteínas pela glicose: a glicação de proteínas e a formação dos produtos finais da glicação avançada (glicoxidação). A reação de glicação não enzimática e dependente da concentração entre glicose e proteínas modifica a estrutura e função das proteínas afetadas. As proteínas glicadas (produtos de Amadori) são substratos para a formação de produtos finais da glicação avançada (glicoxidação) (AGE). Também as trioses fosfato originadas na glicólise e o aumento da atividade da via do poliol podem gerar precursores reativos de AGE, como o metilglioxal e a 3-desoxiglicosona. (Compare com a Fig. 44.6).

Quadro clínico

Um homem de 56 anos com desconforto torácico relacionado com o esforço: diabetes e cardiopatia isquêmica

Um homem de 56 anos foi encaminhado para uma clínica de cardiologia de ambulatório para investigação de desconforto no peito sentido durante subidas íngremes e durante períodos de estresse ou excitação. O paciente media 1,70 m e pesava 102 kg. Sua pressão arterial era de 160/98 mmHg (limite superior ao normal 140/90 mmHg), a concentração de triglicerídios de 4 mmol/L (364 mg/dL) (nível desejável: 1,7 mmol/L, 148 mg/dL) e a glicose plasmática em jejum de 6,5 mmol/L (117 mg/dL). O ECG em repouso era normal, mas durante a prova de esforço observou-se um padrão isquêmico.

Comentário

Esse homem obeso apresentou hipertensão arterial, hipertrigliceridemia e anomalia da glicemia em jejum. A anomalia da glicemia em jejum, neste caso, está relacionada com a resistência periférica à insulina. Esse conjunto de alterações é conhecido como síndrome metabólica, e está associado a um risco aumentado de doença cardíaca coronária.

Oxidação, rearranjo, desidratação e fragmentação adicionais dos produtos de Amadori levam à formação de uma família de compostos conhecidos como **produtos finais da glicação avançada (também conhecida como glicoxidação)** (AGE). Esse processo gera, ainda, compostos que possuem grupos carbonila muito ativos quimicamente, como 3-desoxiglicosona, glioxal e metilglioxal (Fig. 21.18 e Fig. 44.6). Alguns dos AGEs são na verdade ligações proteicas cruzadas que se formam, por exemplo, no colágeno ou na mielina, diminuindo a elasticidade destas proteínas. Os AGEs se acumulam normalmente com o aumento da idade biológica, mas essa acumulação é mais rápida no diabetes, na presença de hiperglicemia. Os AGEs se ligam a seus receptores de membrana nas células endoteliais, gerando estresse oxidativo. Isso vai lesar o endotélio e estimular a via pró-inflamatória que envolve o fator de transcrição NFκB. O NFκB, por sua vez, controla a expressão de uma variedade de citocinas inflamatórias, como o TNF-α, a IL-1α e a IL-6. O resultado é uma inflamação crônica de baixo grau, que vai lesar ainda mais o endotélio vascular. Assim, a formação de AGEs é um fator que contribui para o desenvolvimento de complicações microvasculares do diabetes. Contribui, do mesmo modo, para a aterogênese. Os AGEs podem também estar envolvidos na patogênese de outras doenças relacionadas com a idade, como a doença de Alzheimer.

Além disso, as ROS geradas durante a hiperglicemia comprometem o relaxamento dependente do endotélio das células musculares lisas vasculares. Isso ocorre porque o vasodilatador óxido nítrico (NO), gerado pelas células endoteliais a partir da arginina, é rapidamente desativado pelo superóxido, formando o radical peroxinitrito, que é ele próprio um oxidante. As ROS interferem também nas cascatas de sinalização, afetando, por exemplo, a ativação da proteína cinase C. A hiperglicemia aumenta também a quantidade de doadores de prótons na mitocôndria, causando um aumento na diferença de potencial eletroquímico da membrana mitocondrial interna e, consequentemente, aumentando a formação de ROS pela cadeia respiratória (Fig. 37.4). Foi sugerido que a produção mitocondrial aumentada de ROS é a causa primária de complicações a longo prazo do diabetes.

A atividade aumentada da via do poliol está associada à neuropatia diabética e a cataratas oculares

A hiperglicemia altera o estado redox da célula, ao aumentar a razão NADH/NAD^+ e ao diminuir a razão NADPH/$NADP^+$. Essa alteração dirige os substratos para a **via do poliol,** onde a glicose é reduzida a sorbitol pela aldose redutase (Fig. 21.19). É importante notar que, uma vez que a síntese de NO a partir da arginina requer NADPH, a aldose

redutase e a óxido nítrico sintase competem por este composto. O sorbitol é adicionalmente oxidado a frutose pela sorbitol desidrogenase. A aldose redutase tem um K_m elevado para a glicose; desta forma, a via do poliol não está muito ativa para concentrações normais de glicose. No entanto, durante a hiperglicemia, quando a concentração de glicose em tecidos independentes de insulina (como os eritrócitos, o nervo ou o cristalino) aumenta, a via é ativada. De forma similar à glicose, o sorbitol é osmoticamente ativo. Sua acumulação no tecido ocular contribui para o desenvolvimento de cataratas diabéticas. No tecido nervoso, altas concentrações de sorbitol diminuem a captação celular de outro álcool, o mioinositol, inibindo a ATPase Na^+/K^+ de membrana e afetando assim a função nervosa. A acumulação de sorbitol, a hipóxia e o fluxo sanguíneo reduzido no tecido nervoso contribuem para o desenvolvimento da neuropatia diabética. Os processos que contribuem para as complicações a longo prazo do diabetes estão resumidos na Figura 21.20.

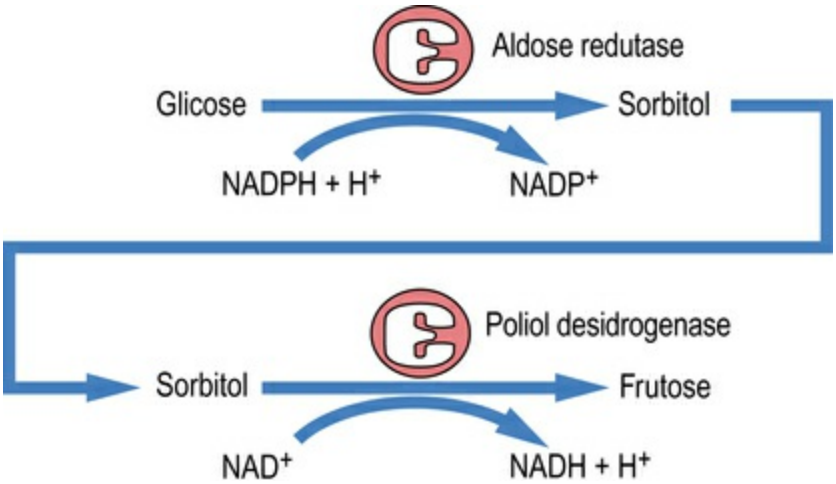


FIG. 21.19 A via do poliol. A via do poliol contribui para o desenvolvimento da neuropatia diabética. Essa via pode ser inibida por inibidores de sua enzima limitante, a aldose redutase.

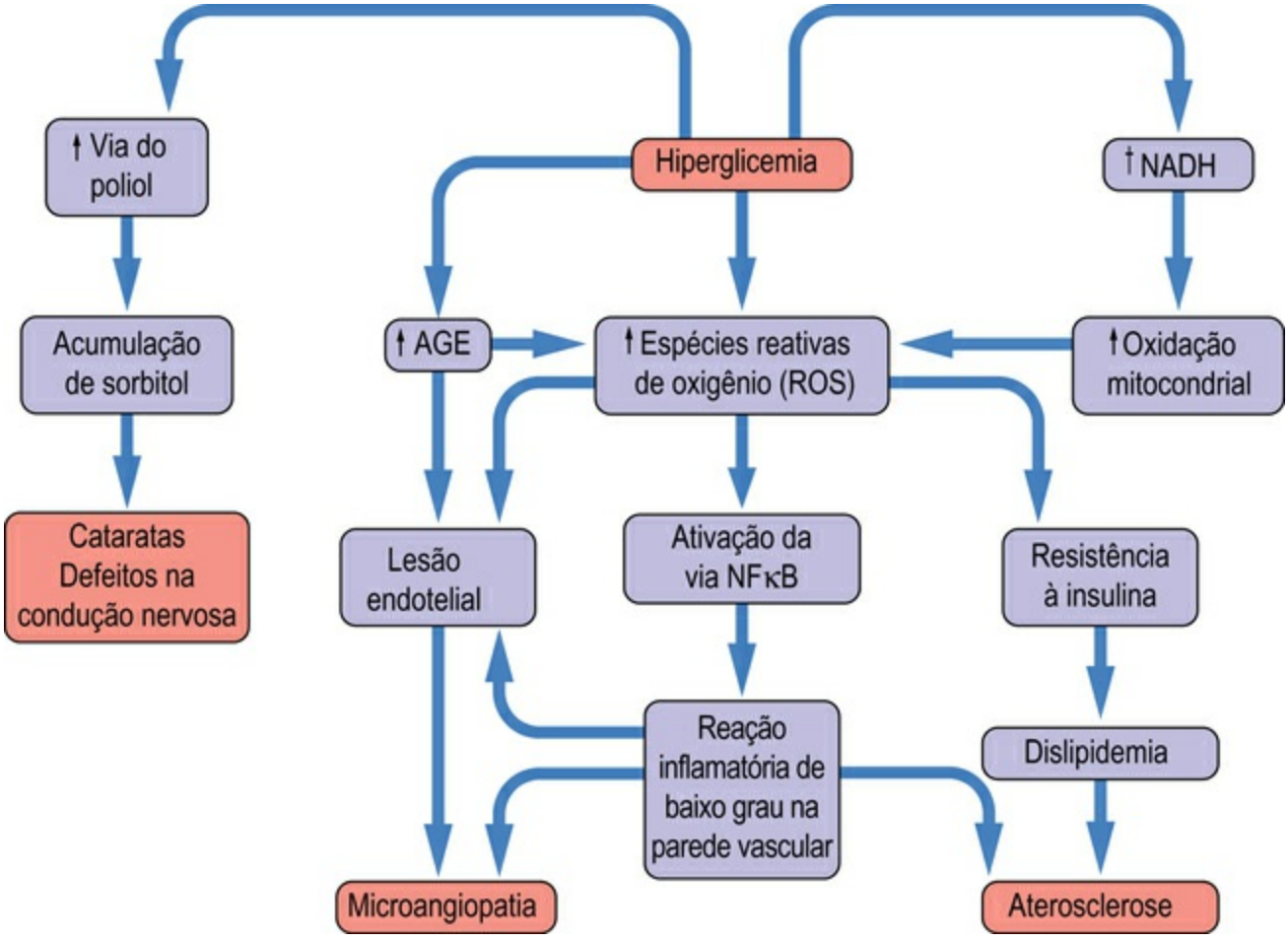


FIG. 21.20 Complicações microvasculares e macrovasculares do diabetes melito. O mau controle da glicemia está associado ao desenvolvimento de complicações microvasculares no diabetes tipo 1 e tipo 2, e ao risco cardiovascular aumentado (este último particularmente no diabetes tipo 2). O estresse oxidativo, a glicação de proteínas e a formação de produtos finais de glicação avançada (glicoxidação) (AGE) são os mecanismos candidatos mais importantes para o desenvolvimento de complicações microvasculares. A hiperglicemia estimula a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelo aumento do fluxo de equivalentes redutores na cadeia respiratória e pela formação aumentada de AGEs. Os AGEs também geram ROS em diferentes etapas de seu metabolismo. A toxicidade das ROS está associada à modificação estrutural e funcional de proteínas e à estimulação de fenômenos inflamatórios induzidos, por exemplo, pela via pró-inflamatória do NFκB. As ROS lesam o endotélio e interferem na sinalização da insulina, contribuindo para a resistência à insulina. A inflamação de baixo grau e a resistência à insulina são particularmente importantes na aterogênese, causando doença macrovascular (Cap. 18). Note que o estresse oxidativo aumentado e a inflamação crônica de baixo grau também têm sido observados na obesidade.

Hipoglicemia

Hipoglicemia (glicose sanguínea baixa) é a concentração de glicose no sangue inferior a 4 mmol/L (72 mg/dL). A glicose plasmática baixa estimula o sistema nervoso simpático. A epinefrina e o glucagon são liberados, iniciando a resposta ao estresse. Essa resposta se manifesta com sudorese, tremor, taquicardia e uma sensação de fome. A diminuição do fornecimento de glicose ao sistema nervoso (neuroglicopenia) **compromete a função cerebral:** a pessoa afetada fica confusa e pode perder a consciência (isso acontece geralmente quando a concentração de glicose desce abaixo de 2,5 mmol/L (45 mg/dL)). A hipoglicemia profunda pode ser fatal.

A hipoglicemia em indivíduos saudáveis é normalmente ligeira e pode ocorrer durante o exercício, após um período de jejum ou em resultado do consumo de álcool. O álcool aumenta a razão intracelular de NADH/NAD^+: isto favorece a conversão do piruvato em lactato e reduz a quantidade de piruvato disponível para a gliconeogênese. A hipoglicemia pode ainda ocorrer quando existe uma quantidade insuficiente de hormônios contrarreguladores para balancear os efeitos da insulina; isso ocorre na insuficiência adrenal (Cap. 39). Outra causa endócrina de hipoglicemia é um tumor raro de células β, o insulinoma, que pode secretar grandes quantidades de insulina. As causas raras de hipoglicemia na infância são as doenças do armazenamento do glicogênio (Cap. 13 e Quadro Clínico na página 157). As causas de hipoglicemia estão resumidas na Figura 21.21.



FIG. 21.21 Hipoglicemia. A hipoglicemia é a concentração plasmática de glicose abaixo de 4 mmol/L (72 mg/dL). A hipoglicemia grave é a concentração de glicose abaixo de 2,5 mmol/L (45 mg/dL). A hipoglicemia pode resultar do fornecimento de glicose diminuído ou do aumento da secreção de insulina. Também resulta da utilização aumentada de glicose pelos tecidos (p. ex., durante o exercício).

A hipoglicemia é a complicação aguda mais comum do diabetes

É importante relembrar que a complicação aguda mais comum do diabetes não é a cetoacidose, mas sim a hipoglicemia. A hipoglicemia pode ocorrer no T1D e no T2D. Resulta do desequilíbrio entre a dose de insulina, o fornecimento de carboidratos e a atividade física. Assim, pode ocorrer após a administração de uma dose muito elevada de insulina ou após a perda de uma refeição. Como o exercício aumenta a captação de glicose independente de insulina pelos tecidos, os pacientes diabéticos para evitar a hipoglicemia necessitam diminuir a dose de insulina antes de exercício físico intenso. A hipoglicemia ligeira pode ser controlada com a ingestão de uma bebida açucarada ou de alguns grãos de açúcar. A hipoglicemia grave, por outro lado, é uma emergência médica que requer tratamento com glicose intravenosa ou injeção intramuscular de glucagon. Note que o grau de controle diabético atingido durante o tratamento do diabetes está inversamente relacionado com o risco de hipoglicemia (quanto melhor o controle, maior o risco).



Quadro clínico

Um menino de 12 anos, diabético, que perde a consciência no campo de jogos: hipoglicemia

Um menino diabético de 12 anos estava jogando com os amigos. Foi-lhe administrada sua injeção de insulina normal pela manhã, mas continuou a jogar durante a hora do almoço sem se alimentar. Foi ficando cada vez mais confuso e finalmente perdeu a consciência. Recebeu uma injeção de glucagon do estojo de emergência transportado pelo pai e recuperou-se em minutos. **A hipoglicemia grave é uma emergência médica.**

Comentário

A melhoria imediata após injeção de glucagon confirma que os sintomas da criança foram causados por hipoglicemia, causada pela combinação de administração de insulina exógena com a ingestão insuficiente de alimento. A recuperação da hipoglicemia se deveu à ação do glucagon. No hospital, os pacientes hipoglicêmicos que não podem comer ou beber são geralmente tratados com glicose intravenosa de elevada concentração. Uma injeção intramuscular de glucagon é uma medida de emergência que pode ser aplicada em casa.

Avaliação laboratorial do metabolismo energético

Diagnóstico e monitorização de pacientes com diabetes melito

A medição da concentração plasmática de glicose é o teste diagnóstico-chave para o diabetes melito

A análise da concentração plasmática de glicose é o teste mais importante do metabolismo energético. Deve ser interpretada em relação ao ciclo alimentação-jejum. O melhor momento para avaliar o metabolismo dos carboidratos é após um jejum de 8-12 horas (Fig. 21.11), quando o metabolismo energético atinge um estado de equilíbrio.

A concentração de glicose medida independentemente do horário das refeições é conhecida como **glicose plasmática ocasional.** É útil para o diagnóstico de hipoglicemia ou hiperglicemia grave, mas é menos importante na avaliação do significado de uma hiperglicemia ligeira.

As análises diagnósticas para o diabetes são a concentração de **glicose em jejum** (sem aporte calórico durante aproximadamente 10 horas) e a concentração medida 2 horas após a ingestão oral de uma quantidade de glicose padronizada.

Ao interpretar a concentração de glicose, é clinicamente importante saber se é normal **(normoglicemia),** demasiado elevada **(hiperglicemia)** ou demasiado baixa **(hipoglicemia).** A interpretação adicional da hiperglicemia inclui o diagnóstico de diabetes ou a identificação de estágios intermédios (pré-diabéticos) do metabolismo.

Existe um *continuum* entre os estágios normal, pré-diabético e diabético

A glicose plasmática de um indivíduo em jejum é notavelmente estável. As anormalidades pré-diabéticas do metabolismo dos carboidratos são definidas como anomalia da glicemia em jejum (IFG) e diminuição da tolerância à glicose (IGT). A Associação de Diabetes Americana (ADA) recomenda o diagnóstico da IFG. A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda o diagnóstico da IGT, também aceito na Europa.

Os limiares diagnósticos para o diabetes melito são baseados na evidência de que concentrações mais altas de glicose em jejum constituem um risco para o desenvolvimento de complicações microvasculares. A IGT está de igual modo associada a risco cardiovascular, enquanto a IFG é um fator de risco para o desenvolvimento futuro de diabetes.

Habitualmente, a concentração plasmática de glicose em jejum deve permanecer abaixo dos 6,1 mmol/L (110 mg/dL). A IGT é caracterizada por um nível normal de glicemia em jejum, mas uma concentração elevada 2 horas após uma carga de glicose. A IFG é definida como um nível "intermédio" de glicose plasmática em jejum (superior a 6,0 mmol/L, mas inferior a 7,0 mmol/L [126 mg/dL]). Uma glicose plasmática em jejum de 7,0 mmol/L (126 mg/dL) ou superior, se confirmada, é diagnóstica para diabetes. O diagnóstico laboratorial do diabetes é resumido na Tabela 21.6.

Tabela 21.6

Equivalência das unidades das medições de hemoglobina glicada (HbA_{1c}) usando método tradicional (DCCT) e de referência (IFCC)

Unidades DCCT %	Unidades IFCC (mmol/mol)
5	31
6	42
7	53
10	86

Modificado de: Misra S, Hancock M, Meeran K, Dornhorst A, Oliver NS. HbA1c: an old friend in new clothes. Lancet 377:1476–1477, 2011. DCCT, Diabetes Control and Complications Trial; IFCC, International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine.

A prova de tolerância à glicose oral (PTGO) avalia a glicose sanguínea em resposta a uma carga de carboidratos

A OMS recomenda que a PTGO seja realizada a todos os pacientes cuja glicose plasmática em jejum se encontre na categoria de IFG. A PTGO deve ser realizada sob condições padronizadas. O paciente deve ser avaliado de manhã, após aproximadamente 10 horas de jejum. Para evitar alterações da glicose plasmática relacionadas com o estresse ou exercício, a pessoa deve permanecer sentada durante o exame. Essa avaliação não deve ser realizada durante, ou imediatamente após, uma doença aguda. Durante o exame, é inicialmente medida a glicose plasmática em jejum. Em seguida, é dada ao

paciente uma quantidade- padrão de glicose para beber (75 g em 300 mL de água) e após 120 minutos é novamente medida a concentração plasmática de glicose (Fig. 21.22). Em alguns protocolos a glicose é medida aos 20, 60 e 120 minutos. Normalmente, a glicose plasmática deverá atingir seu pico de concentração após aproximadamente 60 minutos e regressar ao estado de quase jejum após 120 minutos. Se permanecer acima de 11,1 mmo/L (200 mg/dL/min) na amostra dos 120 minutos, é feito o diagnóstico de diabetes, mesmo que a glicemia em jejum seja normal. Glicemias em jejum não diabéticas com concentrações após a carga de glicose entre 6,1 e 7,8 mmol/L (100-140 mg/dL) significam IGT. A interpretação da PTGO é resumida na Tabela 21.7.

Tabela 21.7

Critérios diagnósticos para diabetes melito e intolerância à glicose

Condição	Critério diagnóstico (mmol/L)	Critério diagnóstico (mg/dL)
Glicose plasmática em jejum normal	Inferior a 6,1	Inferior a 110
Anomalia da glicemia em jejum (IFG)	Igual ou superior a 6,1, mas inferior a 7,0	Igual ou superior a 110, mas inferior a 126
Diminuição da tolerância à glicose (IGT)	Glicose plasmática durante a PTGO, 2 horas após ingestão de 75 g, de 7,8 ou superior, mas inferior a 11,1	Glicose plasmática durante a PTGO, 2 horas após ingestão de 75 g, de 140 ou superior, mas inferior a 200
Diabetes melito*		
Critério 1	Glicose plasmática ocasional de 11,1 ou superior†	Glicose plasmática ocasional de 200 ou superior†
Critério 2	Glicose plasmática em jejum de 7,0 ou superior	Glicose plasmática em jejum de 126 ou superior
Critério 3	Glicemia das 2 horas na PTGO de 11,1 ou superior	Glicemia das 2 horas na PTGO de 200 ou superior
Critério 4	HbA_{1c} > 48 mmol/mol (6,5%)	

*Se um dos critérios é cumprido, o diagnóstico é provisório. O diagnóstico necessita ser confirmado no dia seguinte usando um critério diferente.

†Se acompanhado de sintomas (poliúria, polidipsia, perda de peso involuntária). Estes são os critérios propostos pela American Diabetes Association, 1997 (ver Leituras Sugeridas).

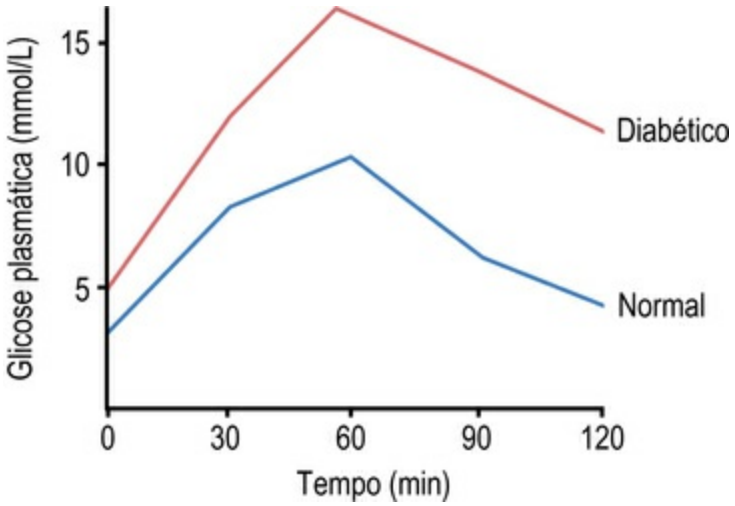


FIG. 21.22 Prova de tolerância à glicose oral (PTGO). O princípio do teste é a medição da concentração plasmática de glicose antes e após a ingestão de uma quantidade padrão de glicose oral (75 g). A concentração de glicose aumenta, alcançando um pico entre 30 a 60 minutos após a ingestão. Deve retornar a valores próximos aos do jejum após 2 horas. Note os valores mais altos de glicose plasmática em todos os momentos, em um paciente diabético.

A concentração de hemoglobina glicada (HbA_{1c}) reflete a concentração média da glicose plasmática

Conhecer a concentração plasmática média de glicose ao longo de um período de tempo é clinicamente muito relevante, uma vez que está relacionada com o risco de desenvolvimento de complicações tardias do diabetes. A tentativa de avaliar a glicemia média através da realização de múltiplas análises da glicose plasmática é, no entanto, muito incômoda. Em vez disso, a hemoglobina glicada (hemoglobina A_{1c}, HbA_{1c}) é medida com esse propósito. A HbA_{1c} se forma nos eritrócitos a uma velocidade proporcional à concentração de glicose existente. Como a reação de glicação é irreversível, a $HbA1_c$ permanece em circulação durante todo o tempo de vida do eritrócito. Sua quantidade vai refletir a concentração média de glicose plasmática (Fig. 21.23) ao longo das 8-12 semanas prévias à análise, aproximadamente. O período de tempo exato que a análise reflete é difícil de determinar com precisão, uma vez que em qualquer momento o plasma contém populações de eritrócitos de diferentes idades. Valores como 3-6 e 4-8 semanas também têm sido descritos na literatura. A exposição à glicose nos últimos 30 dias antes da análise contribui para aproximadamente 50% das alterações observadas na HbA_{1c}.

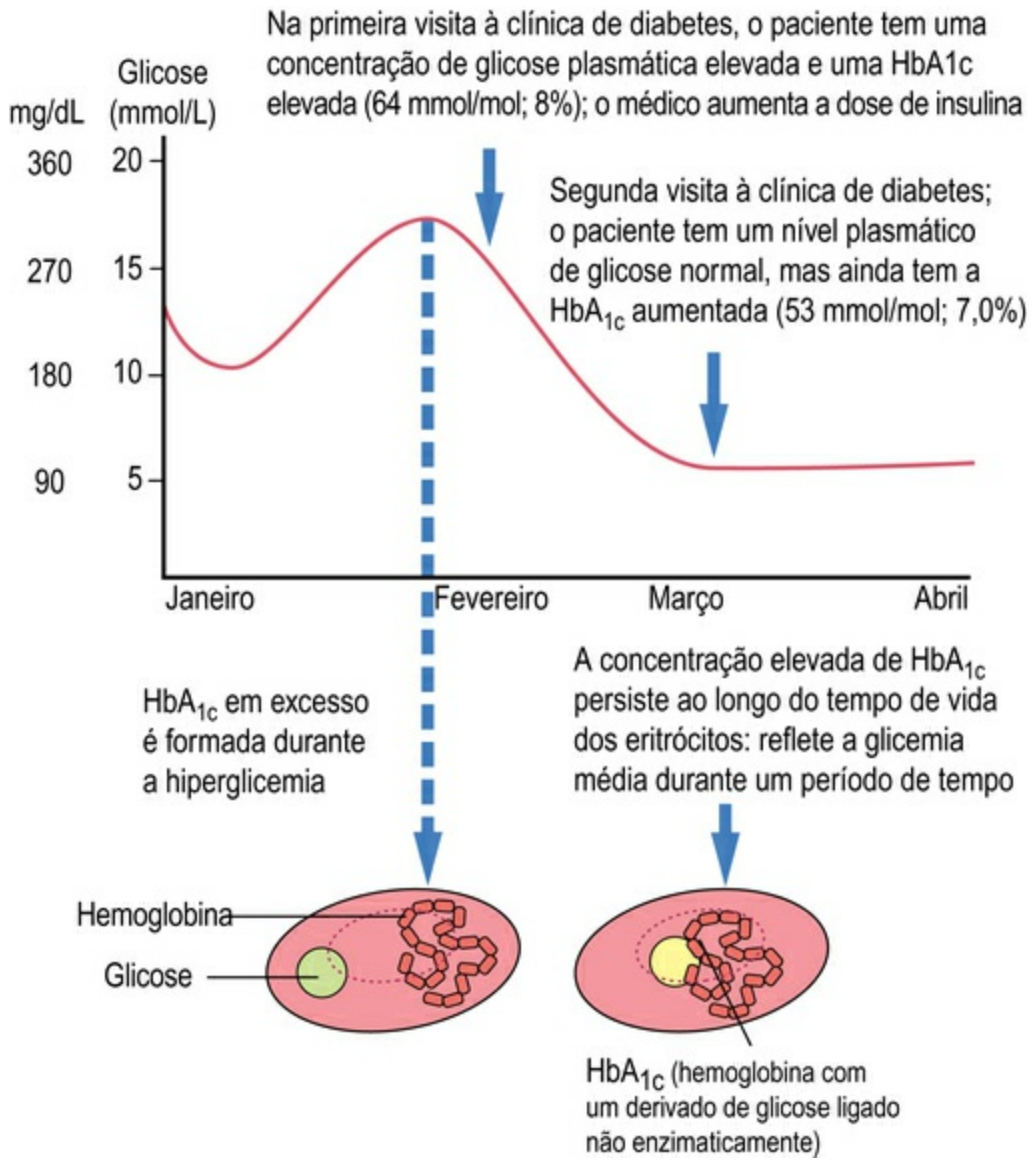


FIG. 21.23 Hemoglobina A_{1c}. A hemoglobina A_{1c} (HbA_{1c}) é a hemoglobina A modificada após a tradução por uma glicação não enzimática. O grau de glicação é proporcional à exposição da hemoglobina à glicose durante o tempo de vida de um eritrócito. As medições da HbA_{1c} são utilizadas para a monitorização do controle glicêmico e recentemente para o diagnóstico de diabetes. Observe que a introdução de um novo método de referência para a HbA_{1c} resultou na modificação das unidades, da tradicional (%) para mmol/mol. As fórmulas de conversão estão disponíveis (Tabela 21.6). Para obter as concentrações de glicose em mg/dL, multiplique por 18.

Originalmente, a HbA_{1c} era medida como uma porcentagem da hemoglobina total. Recentemente, um método de referência capaz de medir a quantidade absoluta de HbA_{1c} foi introduzido pela International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC). O novo método é baseado na clivagem do hexapeptídio *N*-terminal da cadeia β da HbA_{1c} por uma endopeptidase, e na subsequente separação e quantificação por espectrometria de massa ou eletroforese capilar. As unidades utilizadas são mmol/mol. Os valores obtidos pelos dois métodos podem ser comparados usando uma fórmula de conversão (Apêndice 1). Essa comparação é demonstrada na Tabela 21.6. Note que a concentração de HbA_{1c} pode ser afetada pela presença de anemia ou de variantes da hemoglobina.

Os valores de HbA_{1c} podem ser usados para o diagnóstico de diabetes e para

monitorar o controle glicêmico

As normas de atuação desenvolvidas pela ADA (2012) e pela OMS (2011) definem o valor de 48 mmol/mol (6,5%) ou superior como diagnóstico para diabetes. Os valores de HbA_{1c} são também utilizados na prática clínica para estabelecer objetivos para o tratamento. A concentração normal de HbA_{1c} é inferior a 6%. A ADA recomenda que em um paciente diabético o objetivo seja atingir uma concentração abaixo de 7% (53 mmol/mol). Em alguns pacientes, particularmente em crianças jovens e idosos, esse valor pode ser difícil de atingir devido ao risco de hipoglicemia, e os objetivos devem ser ajustados para minimizar esse risco.

A glicose urinária não é um teste diagnóstico para diabetes

Na presença de uma concentração normal de glicose plasmática, a glicose filtrada nos glomérulos renais é reabsorvida nos túbulos proximais renais e não aparece na urina (Cap. 23). O limiar urinário para a reabsorção de glicose é de aproximadamente 10,0 mmol/L (180 mg/dL). Perante concentrações superiores, a capacidade reabsortiva do sistema de transporte tubular renal é excedida e a glicose aparece na urina (conhecido como glicosúria). Observe que uma pessoa saudável pode ter um limiar de glicose renal baixo e, assim, demonstrar glicosúria para níveis sanguíneos de glicose não diabéticos. Por conseguinte, o diabetes não pode ser diagnosticado com base apenas em um exame de urina.



Quadro clínico

Um menino com má adesão à terapêutica do diabetes: discrepância de resultados entre a glicose e HbA_{1c}

Um menino de 15 anos, dependente de insulina, visitou a clínica de diabetes para uma avaliação geral de rotina. Relatou ao médico que seguia todas as recomendações dietéticas e que nunca se esquecia das injeções de insulina. Embora apresentasse uma glicose sanguínea ocasional de 6 mmol/L (108 mg/dL), a concentração de HbA_{1c} era de 86 mmol/mol (11%) (controle adequado: abaixo de 53 mmol/mol, 7%). Não apresentava glicosúria ou cetonúria.

Comentário

Os resultados da glicose sanguínea e urinária indicam um bom controle do diabetes desse paciente no momento da medição, mas o nível de HbA_{1c} sugere um mau controle ao longo das últimas 3 a 6 semanas. É provável que apenas tenha havido cumprimento terapêutico nos dias antes da ida à clínica. Essa situação é comum em adolescentes, porque estes têm dificuldade de aceitar a necessidade de ajustar seus estilos de vida ao tratamento do diabetes, algumas vezes exigente. As medições de HbA_{1c} identificam pacientes diabéticos que não cumprem a terapêutica.

Corpos cetônicos na urina de uma pessoa diabética significam descompensação metabólica

Concentrações altas de cetonas na urina (cetonúria) refletem uma elevada taxa de lipólise. Uma cetonúria ligeira pode ocorrer em indivíduos saudáveis durante um jejum prolongado ou em uma dieta rica em gordura. No entanto, em um paciente diabético, **a cetonúria é um sinal importante de descompensação metabólica** e requer ajuste do regime terapêutico.

A excreção urinária de albumina é importante na avaliação da nefropatia diabética

O desenvolvimento de nefropatia diabética pode ser previsto pela detecção de pequenas quantidades de albumina na urina (microalbuminúria). Para isso os laboratórios utilizam um método mais sensível que o usado convencionalmente para a medição de albumina plasmática. O teste é positivo se mais de 200 g de albumina forem excretados na urina ao longo de 24 horas. A presença de mais de 300 mg/dia de proteínas na urina significa proteinúria evidente. Em pacientes diabéticos as concentrações plasmáticas de creatinina e ureia são também avaliadas rotineiramente (Cap. 23).

O aumento do lactato plasmático indica oxigenação inadequada

O nível elevado de lactato no plasma indica o aumento do metabolismo anaeróbico e é um marcador de oxigenação inadequada dos tecidos (hipoxia; Cap. 5). Em situações extremas, como a paragem cardíaca, esse aumento do metabolismo anaeróbico causa acidose grave (acidose lática). No diabetes, as medições do lactato plasmático são importantes em casos raros de coma hiperglicêmico não cetônico, uma patologia potencialmente fatal que se apresenta com níveis muito elevados de glicose plasmática e desidratação extrema, na ausência de cetoacidose.

Os pacientes diabéticos necessitam de seguimento regular

Durante a observação periódica de um paciente diabético, o médico deve verificar a glicemia e a concentração de HbA_{1c} para avaliar o controle glicêmico. Deve ser realizado um exame oftalmológico (para pesquisar sinais de retinopatia) e um exame neurológico (neuropatia). Devem ainda ser realizados doseamentos da ureia e creatinina no plasma, de microalbumina/proteínas na urina (para determinar a presença, ou avaliar o risco, de nefropatia) e de lipídios plasmáticos (para verificar a pressão sanguínea e avaliar o risco de doença cardiovascular; Cap. 18).

Tratamento do diabetes

O controle da glicemia previne o desenvolvimento de complicações do diabetes

O objetivo do tratamento do diabetes é a **prevenção de complicações agudas e crônicas.** A manutenção de um bom controle glicêmico é fundamental na abordagem do diabetes. Dois grandes estudos clínicos, o Diabetic Control and Complications Trial (DCCT) no T1D e o UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) no T2D confirmaram que as

complicações microvasculares estão associadas à gravidade da hiperglicemia (Leituras Sugeridas). Existe igualmente forte evidência de que as intervenções terapêuticas que incluam o controle da glicemia e do risco cardiovascular são as ideais para a prevenção de complicações a longo prazo. Assim, além do esforço para manter a concentração plasmática de glicose perto do normal, é necessário o controle intensivo de fatores de risco cardiovascular, como a hipertensão e a dislipidemia.

A modificação do estilo de vida é o pilar da prevenção do diabetes e um elemento fundamental em seu tratamento

A dieta e o exercício são fatores fundamentais do estilo de vida na abordagem do diabetes melito e devem estar na base de todos os tratamentos farmacológicos. São também medidas preventivas essenciais — e muitas vezes subvalorizadas. O estudo Diabetes Prevention Program demonstrou uma diminuição de 58% no desenvolvimento de T2D após intervenções no estilo de vida envolvendo dieta e exercício (Leituras Sugeridas). Infelizmente, a glicemia pode ser controlada apenas com intervenções no estilo de vida em menos de 20% de todos os pacientes diabéticos.

Pacientes com diabetes tipo 1 são tratados com insulina

A insulina permanece absolutamente necessária para o tratamento do T1D. Estão disponíveis diferentes preparações de insulina que diferem na duração de sua ação. A insulina "clássica" de ação curta é a insulina humana regular, as insulinas de ação intermédia são as insulinas Isofânica e Lente e a insulina de ação longa é a insulina Ultralente. Os novos análogos da insulina humana são a insulina lispro e a insulina aspart (ação curta), e a insulina detemir e a insulina glargina (ação muito longa).

Os protocolos-padrão de tratamento com insulina envolvem injeções subcutâneas diárias ao longo da vida

Os pacientes normalmente fazem duas injeções subcutâneas por dia de insulina de ação intermédia, ou de uma mistura de insulina de ação curta e intermédia. A mais recente abordagem do basal-bólus envolve a insulina glargina ou detemir, usadas como componente basal, e a insulina lispro ou aspart como bólus adicionados antes das refeições.

O maior desafio do tratamento com insulina é replicar os padrões diários normais de secreção de insulina com as injeções de insulina. Múltiplas injeções de insulina de ação curta são usadas em pacientes em que a glicemia é particularmente difícil de controlar. Em raras ocasiões, uma infusão constante de insulina é necessária: essa infusão é feita através de uma bomba portátil programada para aumentar a velocidade de administração de insulina no momento das refeições.

O tratamento de emergência da cetoacidose diabética inclui insulina intravenosa, reidratação e suplementação de potássio

O tratamento de emergência da cetoacidose diabética aborda cinco problemas: a falta de insulina, a desidratação, a depleção de potássio, a acidose e a causa primária de

descompensação. É necessária uma infusão de insulina para reverter o efeito metabólico do excesso de hormônios anti-insulínicos e são também administrados fluidos para tratar a desidratação. Os fluidos intravenosos administrados normalmente contêm potássio para prevenir a hipocalemia associada à entrada de potássio para as células causada pela insulina. Esse tratamento é geralmente suficiente para controlar a acidose metabólica; no entanto, quando a acidose é grave, a infusão de uma solução alcalinizante (bicarbonato de sódio) pode também ser necessária (ver o caso descrito na página 281). As causas primárias como, por exemplo, infecção, devem do mesmo modo ser tratadas agressivamente.

Pacientes com diabetes tipo 2 são tratados com fármacos hipoglicemiantes orais, mas podem necessitar de insulina

Os pacientes com T2D normalmente não necessitam de tratamento com insulina, uma vez que sua síntese de insulina está pelo menos parcialmente preservada; esses pacientes podem ser tratados com fármacos hipoglicemiantes. No entanto, se não for possível atingir o controle adequado, esses pacientes necessitam de insulina: a cada ano, 5-10% dos pacientes tratados com fármacos hipoglicemiantes necessitam iniciar tratamento com insulina.

Fármacos antidiabéticos

Os fármacos hipoglicemiantes orais usados atualmente têm como alvo três processos: a secreção de insulina, a sensibilidade dos tecidos à insulina e a absorção e digestão de carboidratos.



Quadro clínico

A cetoacidose diabética afeta o balanço de potássio

A insulina aumenta a captação celular de potássio, e a falta de insulina leva à liberação de potássio das células. Como o diabetes não controlado é também acompanhado de diurese osmótica, o potássio liberado é excretado na urina. Como resultado, **a maioria dos pacientes admitidos com cetoacidose estão esgotados em potássio**, mas, paradoxalmente, têm com frequência níveis de potássio plasmático normais ou aumentados. Quando a insulina exógena é administrada a esses pacientes, vai estimular a entrada de potássio nas células e pode levar a níveis de potássio plasmático muito baixos **(hipocalemia).** A hipocalemia é perigosa devido a seus efeitos no músculo cardíaco. Portanto, exceto para pacientes com concentrações plasmáticas muito altas, o potássio deve ser administrado durante o tratamento de cetoacidose diabética. (Ver também Caps. 22 e 23).

Quadro de conceitos avançados

Papel regulador do fator de transcrição ppar-γ

Os receptores ativados por proliferador de peroxissoma (PPARs) são receptores nucleares ativados por ligandos, pertencentes à família dos receptores de esteroides. A ligação de um ligando induz uma mudança conformacional que permite a um PPAR formar um heterodímero com outro receptor, o receptor X de retinoide (RXR). O PPAR também pode se ligar a pequenas moléculas, coativadoras ou correpressoras. O complexo se liga a elementos de resposta nos promotores dos genes (Fig. 21.9).

Existem três tipos de PPAR: **PPAR-α,** que são discutidos no Capítulo 18, **PPAR-γ** e **PPAR-β.** O PPAR-γ é predominantemente expresso no tecido adiposo, mas também no músculo, no fígado, no intestino e no coração. É ativado por ácidos graxos poli-insaturados e por componentes da LDL oxidada. Regula o metabolismo de carboidratos e ácidos graxos induzindo, entre outros, os genes que codificam a lipoproteína lipase (LPL), o transportador de glicose GLUT-4 e a glicocinase. Também induz o transportador ABCA1, aumentando a transferência de colesterol das células para a HDL (Cap. 18). Inibe ainda a ativação de macrófagos e a produção de citocinas, tais como o fator de necrose tumoral (TNF-α), o interferon-γ e a interleucina-1 (IL-1). O PPAR-α é um alvo das **tiazolidinedionas,** fármacos usados no tratamento do diabetes tipo 2.

As sulfonilureias, as meglitinidas e os fármacos que afetam o sistema das incretinas estimulam a secreção de insulina

As **sulfonilureias** se ligam a um receptor na membrana plasmática das células β pancreáticas. O receptor contém o canal de potássio sensível a ATP. A ligação do fármaco fecha este canal, despolariza a membrana e abre o canal de cálcio. O aumento da concentração citoplasmática intracelular de cálcio estimula a exocitose de insulina. A hipoglicemia é um efeito adverso substancial do tratamento com sulfonilureias.

As **meglitinidas** têm como alvo o canal de potássio sensível a ATP similarmente às sulfonilureias, mas se ligam em um local diferente.

Os **fármacos que afetam o sistema das incretinas são: agonistas do receptor GLP-1 e inibidores DPP-4.** Os agonistas do receptor GLP-1, como o exenatide ou o liraglutide, aumentam a secreção de insulina. Esses fármacos atuam através da via do AMP cíclico–PKA e potenciam a secreção de insulina induzida pelo aumento da glicose. O GLP-1 endógeno pode também ser aumentado pelo uso de inibidores DPP-4, como a sitagliptina, que previne a degradação do GLP-1, aumentando assim o seu efeito.

As biguanidas e as tiazolidinedionas sensibilizam os tecidos periféricos à insulina

A **metformina,** uma biguanida, é atualmente o tratamento oral mais comum no T2D. A metformina reduz a gliconeogênese hepática e diminui a produção endógena de glicose. Inibe os efeitos do glucagon e aumenta a sensibilidade periférica à insulina. Inibe também a glicogenólise ao inibir a atividade da Glc-6-Pase. A metformina aumenta a

captação de glicose dependente de insulina no músculo esquelético e reduz a oxidação de ácidos graxos.

As **tiazolidinedionas,** como a pioglitazona, atuam ao nível da transcrição. Estes fármacos aumentam a utilização periférica de glicose e a sensibilidade à insulina. São ligandos do fator de transcrição PPAR-γ no tecido adiposo e, em menor extensão, no músculo. A ativação do PPAR-γ aumenta a transcrição de uma variedade de genes responsáveis pelo metabolismo da glicose e dos lipídios, como o gene da lipoproteína lipase, da acil-CoA sintase e do transportador GLUT-4. As tiazolidinedionas ativam também a via de sinalização do IRS-1/fosfoinositol cinase. Promovem a expansão do tecido adiposo subcutâneo, reduzem a lipólise e reduzem a inflamação no tecido adiposo. No entanto, causam aumento de peso.

O grupo de fármacos **glitazar** está atualmente sendo testado; estes agentes estimulam o PPAR-α e o PPAR-γ e assim, além da ação semelhante à das tiazolidinedionas, podem influenciar o metabolismo dos lipídios ao aumentar as HDL e diminuir a concentração plasmática de triglicerídios (Cap. 18).

A acarbose e os inibidores do SGLT2 diminuem a digestão intestinal de glicose

A **acarbose** é um inibidor da α-glicosidase intestinal, que digere açúcares complexos. Esse fármaco atrasa a absorção intestinal de glicose.

A **amilina,** um inibidor do transportador de glicose SGLT2, atrasa o esvaziamento gástrico, promove a saciedade e inibe a secreção de glucagon. É usada como adjuvante ao tratamento com insulina.

Combinações de fármacos usadas no diabetes tipo 2

Se a glicemia não for controlada com dieta e exercício, a metformina é recomendada como terapêutica de primeira linha em pacientes com T2D. A insulina é considerada nos pacientes com sintomas graves ou mau controle glicêmico. Um segundo fármaco oral (p. ex. tiazolidinediona ou sulfonilureia), um agonista do receptor GLP-1 ou a insulina podem ser adicionados mais tarde ao tratamento com metformina.

Resumo

- A homeostasia da glicose envolve o fígado, o tecido adiposo, o músculo esquelético e o pâncreas.
- O organismo alterna entre o estado alimentado e o estado de jejum. As concentrações sanguíneas dos metabólitos mudam durante o ciclo alimentação-jejum e são influenciadas pelo estresse e por doença. Assim, a interpretação dos níveis de metabólitos necessita ser relacionada com o momento das refeições e com a condição clínica geral do paciente.
- A análise da concentração plasmática de glicose faz parte da avaliação de rotina de todos os pacientes admitidos no hospital. As análises da glicose plasmática e da hemoglobina glicada (HbA_{1c}) são usadas para o diagnóstico e monitorização do controle glicêmico. Em pacientes diabéticos são realizadas medições da glicose

plasmática e urinária, dos corpos cetônicos urinários, da HbA_{1c} e análises da função renal, incluindo a microalbuminúria.

- O diabetes tipo 1 é uma doença autoimune causada pela destruição das células β pancreáticas.
- O diabetes tipo 2 resulta da incapacidade das células β funcionalmente comprometidas em compensar a resistência periférica à insulina. O diabetes tipo 2 está fortemente associado à obesidade.
- As complicações a curto prazo do diabetes incluem a hipoglicemia e a cetoacidose. As complicações a longo prazo incluem a retinopatia, a neuropatia e a nefropatia diabéticas. A doença cardiovascular está relacionada com a macroangiopatia diabética. A doença cardiovascular é atualmente a principal causa de morte no diabetes.

Questões para aprendizagem

1. Descreva de que forma a insulina causa um aumento da captação celular de glicose.
2. O que são hormônios anti-insulínicos?
3. Qual o papel do sistema das incretinas na homeostasia da glicose?
4. Por que razão um paciente não diabético, trazido a um serviço de urgência por queimaduras extensas, poderá ter um aumento da concentração plasmática de glicose? Descreva seu estado metabólico.
5. Você pediu a um paciente para se deslocar a uma clínica de ambulatório para avaliação dos triglicerídios plasmáticos. O paciente o questiona sobre se precisa estar em jejum naquele dia. Dê uma resposta e explique suas razões.
6. Pessoas com diminuição da tolerância à glicose desenvolvem complicações vasculares a longo prazo?
7. O que a obesidade e o diabetes melito têm em comum?

Leituras sugeridas

Ahlqvist, E., Ahluvalia, T. S., Groop, L. Genetics of type 2 diabetes. *Clin Chem*. 2011; 57:241–254.

American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes – 2012. *Diabetes Care*. 2012; 35(Suppl 1):S11–S63.

Bliss, M. *The discovery of insulin*. Edinburgh: Paul Harris Publishing; 1983.

Daneman, D. Type 1 diabetes. *Lancet*. 2006; 367:847–858.

Diabetes Control and Complications Trial (DCCT). Research Group: The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1993; 329:977–986.

Diabetes. Prevention Program Research Group: Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med*. 2002; 24:387–388.

Dominiczak, M. H. Obesity, glucose intolerance and diabetes and their links to cardiovascular disease. *Implications for laboratory medicine, CCLM*. 2003; 41:1266–1278.

Drucker, D. J., Nauck, M. A. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet*. 2006; 368:1696–1705.

Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2003; 26:S4–S20.

Jeffcoate, S. L. Diabetes control and complications: the role of glycated hemoglobin, 25 years on. *Diabetic Med*. 2004; 21:6576–6665.

Nolan, C., Damm, P., Prentki, M. Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. *Lancet*. 2011; 378:169–171.

Steck, A. K., Rewers, M. J. Genetics of type 1 diabetes. *Clin Chem*. 2011; 57:176–185.

Stern, M. P. Diabetes and cardiovascular disease. *The 'common soil' hypothesis, Diabetes*. 1995; 44:369–374.

Stumvoll, M., Goldstein, B. J., von Haeften, T. W. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet*. 2005; 365:1333–1346.

Tuchman, A. Diabetes and the public's health. *Lancet*. 2009; 374:1140–1141.

UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet*. 1998; 352:837–853.

Wong, T. Y., Liew, G., Tapp, R. J., et al. Relation between fasting glucose and retinopathy for diagnosis of diabetes: three population-based cross-sectional studies. *Lancet*. 2008; 371:736–743.

Zimmet, P., Alberti, K. G.M. M., Shaw, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*. 2001; 414:782–787.

Sites e downloads

American Diabetes Association: Type 1 diabetes. www.diabetes.org/diabetes-basics/type-1/.

American Diabetes Association: Type 2 diabetes. www.diabetes.org/diabetes-basics/type-2/?loc=DropDownDB-type2.

American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes. 2013. http://care.diabetesjournals.org/content/36/Supplement_1/S11.full.

Diabetes.co.uk. www.diabetes.co.uk/index.html.

Diabetes UK: Type 1 diabetes. http://www.diabetes.org.uk/Guide-to-diabetes/ Type-1-diabetes/IDF Diabetes Atlas. www.idf.org/diabetesatlas/5e/Update2012.

Diabetes UK blogs. http://blogs.diabetes.org.uk.

NHS choices. Diabetes type 2 – symptoms. www.nhs.uk/Conditions/Diabetes-type2/Pages/Symptoms.aspx.

WHO Consultation: Abbreviated Report. Use of glycated haemoglobin (HbA1c) in the diagnosis of diabetes mellitus. www.who.int/diabetes/publications/report-hba1c_2011.pdf.

CAPÍTULO 22

Nutrição e Balanço Energético

Marek H. Dominiczak and Jennifer Logue

Objetivos

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever os mecanismos que controlam a ingestão alimentar.
- Descrever o papel da cinase ativada por AMP na manutenção do balanço energético celular.
- Identificar as principais categorias dos nutrientes e os nutrientes essenciais dentro dessas categorias.
- Relacionar seu conhecimento sobre metabolismo energético com as recomendações nutricionais atuais.
- Caracterizar a desnutrição e a obesidade.
- Discutir a avaliação nutricional.

Introdução

Do ponto de vista bioquímico, a nutrição é uma interação essencial do organismo com o ambiente. A nutrição sustenta a saúde e afeta a suscetibilidade à doença; a desnutrição e a obesidade estão ambas associadas a riscos para a saúde.

O estado nutricional é determinado por fatores biológicos, psicológicos e sociais

Os fatores que determinam o estado nutricional de um indivíduo são os seus antecedentes genéticos, o ambiente, a fase do ciclo de vida, o nível de atividade física e a presença ou ausência de patologia (Fig. 22.1). O estado nutricional é também influenciado pela disponibilidade de alimento, sua palatabilidade e variedade. As deficiências nutricionais podem resultar de dietas inadequadas ou de erros metabólicos geneticamente determinados.



FIG. 22.1 Fatores que determinam o estado nutricional.

Regulação da ingestão alimentar

A ingestão alimentar é controlada pela fome (desejo de comer) e pelo apetite (desejo por um alimento particular)

Os principais centros reguladores do apetite estão localizados nos núcleos hipotalâmicos arqueado e paraventricular, no sistema nervoso central (SNC). Nos humanos, a área do núcleo arqueado é conhecida como núcleo infundibular. O cérebro regula a homeostase energética e é também o regulador primário do peso corporal (Fig. 22.2). Os sinais que controlam a ingestão energética se originam no tecido adiposo e são enviados ao sistema nervoso central. Esses sinais são mediados pela adipocina leptina e pela insulina. Em resposta, o cérebro envia sinais eferentes através de uma rede complexa de neuropeptídios. Estes regulam o apetite e a fome. Os neurônios no núcleo arqueado expressam dois neuropeptídios: o catabólico pró-opiomelanocortina (POMC) e o anabólico neuropeptídio Y (NPY). O POMC é clivado, gerando melanocortinas, como o α-MSH, que diminuem a ingestão alimentar. Por outro lado, a expressão de NPY aumenta quando o tecido adiposo é esgotado e há uma diminuição de leptina. O NPY se liga a neurônios que expressam o hormônio concentrador de melanocortina (MCH) e as orexinas A e B. Estas, por sua vez, estão envolvidas no controle da ingestão alimentar por atuação nos neurônios do tronco encefálico. Esses neurônios se conectam com o córtex cerebral (o centro de saciedade) para promover a fome e estimular outro conjunto de hormônios, como a tiroliberina (TRH), corticoliberina (CRH) e ocitocina. A tiroliberina aumenta a termogênese e a ingestão alimentar, enquanto a corticoliberina diminui a ingestão alimentar e, através da atividade simpática, aumenta o gasto energético. Sinais adicionais que controlam a ingestão alimentar são transmitidos por peptídios gastrintestinais, tais como o glucagon, a colecistocinina, peptídio semelhante ao glucagon, a amilina e o peptídio YY. A grelina, secretada pelo estômago, estimula os neurônios que expressam NPY. É o único peptídio estimulador do apetite conhecido. O

estiramento gástrico também afeta a ingestão alimentar. Finalmente, a hipoglicemia diminui a atividade do centro de saciedade.

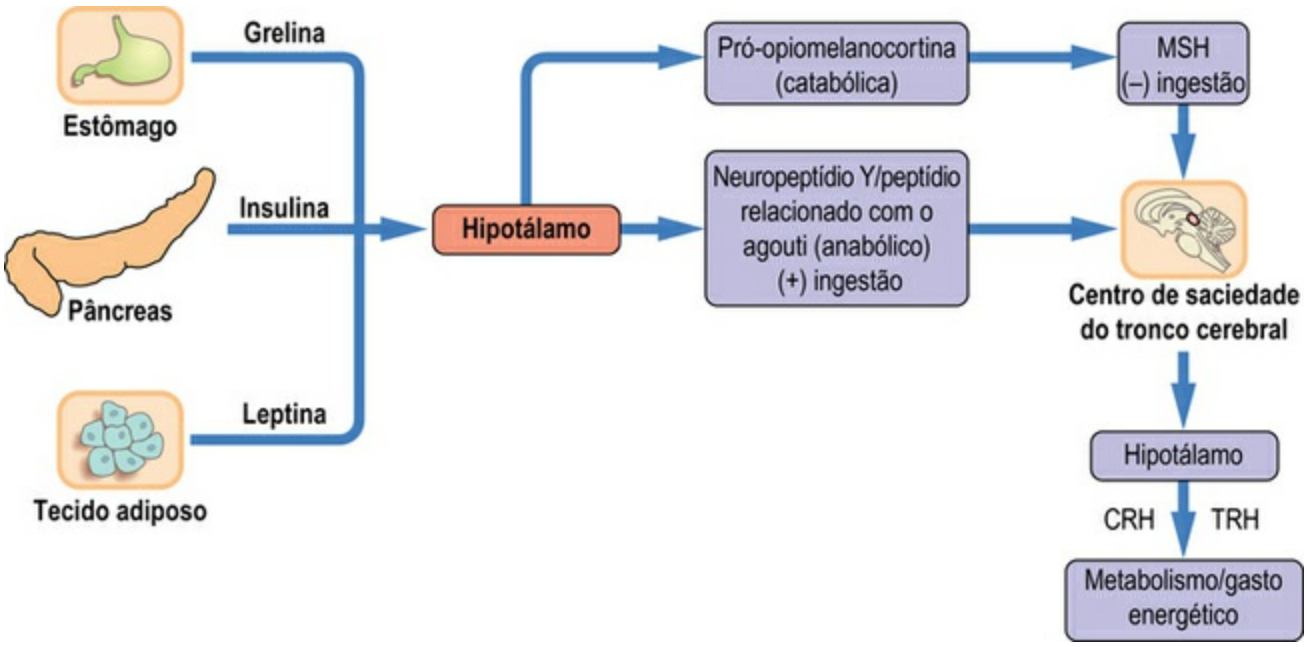


FIG. 22.2 Regulação da ingestão alimentar.
A regulação da ingestão alimentar é executada por sinais gerados no tecido adiposo, pâncreas, estômago e cérebro. O hipotálamo traduz sinais relacionados com o balanço energético em comportamento alimentar através da secreção de uma gama de neuropeptídios. O sinal (+) reflete uma ação que leva ao aumento do apetite e da ingestão alimentar e o sinal (–) indica uma diminuição. CRH, hormônio de liberação da corticotrofina; TRH, tiroliberina; MSH, hormônio estimulador de melanócitos.

O sistema canabinoide endógeno

O hipotálamo e o tronco encefálico traduzem a informação sobre o balanço energético em comportamento alimentar. Isso envolve o sistema canabinoide endógeno. Os endocanabinoides são compostos sintetizados a partir de fosfolipídios de membrana. Estes incluem o Δ^9-tetra-hidrocanabinol e a anandamida, formados em resultado da hidrólise da *N*-araquidonil-fosfatidil-etanolamina pela fosfolipase D. Os endocanabinoides são liberados nas sinapses e se ligam a receptores sinápticos chamados CB1. Os receptores estão presentes no sistema nervoso central, assim como no intestino, tecido adiposo, fígado, músculo e pâncreas. Eles são acoplados a proteínas G e à adenilato ciclase e também regulam canais de cálcio e de potássio. A ligação dos endocanabinoides aos receptores modula a liberação de neurotransmissores como o GABA, noradrenalina, glutamato e serotonina. Os níveis hipotalâmicos de endocanabinoides aumentam durante a privação alimentar.

Regulação do balanço energético

O tecido adiposo é um órgão endócrino ativo

O tecido adiposo, longe de ser um depósito inerte de gordura, é um órgão endócrino ativo (Fig. 22.3). Seus produtos são conhecidos como adipocinas. Essa atividade endócrina influencia o desenvolvimento da obesidade e de condições como a resistência à insulina. As duas principais adipocinas secretadas pelo tecido adiposo são a **leptina** e a **adiponectina.**

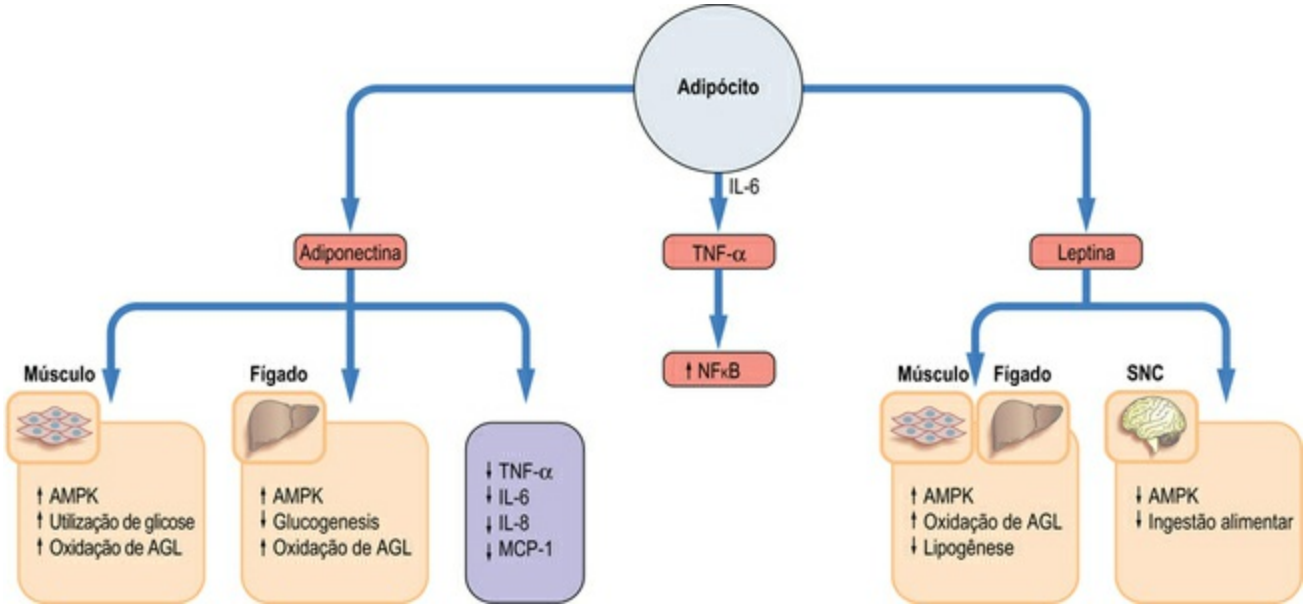


FIG. 22.3 Atividade endócrina do tecido adiposo.
O tecido adiposo produz adipocinas. A leptina e a adiponectina desempenham um papel essencial no ajuste do metabolismo às necessidades energéticas corporais. Elas ativam a "enzima sensora de energia", a cinase ativada por AMP (AMPK). Os adipócitos também secretam uma gama de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF-α ou a IL-6. Sabe-se que o TNF-α estimula o fator de transcrição NFκB, um fator-chave de transcrição na indução de genes envolvidos na resposta inflamatória. AGL, ácidos graxos livres; SNC, sistema nervoso central; IL, interleucina; MCP-1, proteína quimioatratora de monócitos 1; TNF-α, fator de necrose tumoral α.

A leptina regula a massa do tecido adiposo e responde ao estado energético

A leptina é uma proteína de 16 kDa. Sua secreção está ligada à massa de tecido adiposo e ao tamanho dos adipócitos. Atuando no sistema nervoso central, ela **diminui a ingestão alimentar.** Também atua no músculo esquelético, fígado, tecido adiposo e pâncreas. A expressão do gene da leptina é regulada pela ingestão alimentar, estado energético, hormônios e estado inflamatório. Ela afeta o metabolismo por estimulação da oxidação dos ácidos graxos e por diminuição da lipogênese. Observe que ela também diminui a deposição ectópica de gordura no fígado ou no músculo.

A leptina sinaliza através de um receptor membranar que possui um domínio de ligação extracelular e uma cauda intracelular. Suas vias de sinalização envolvem a Janus cinase e o transdutor de sinal e ativador da transcrição (JAK/STAT; Cap. 40). A proteína cinase ativada por mitógenos e a fosfatidil inositol 3'-cinase também estão envolvidas, assim como a cinase ativada por AMP (AMPK).

O abc do tratamento de emergência

Comer e beber, assim como respirar, ligam os organismos vivos ao ambiente. Para sobreviver, precisamos de **oxigênio, água e nutrientes.** Uma pessoa pode sobreviver sem oxigênio apenas por minutos. Sem água, o tempo de sobrevivência é de dias. Com o fornecimento de ambos, um humano pode sobreviver sem comida entre 60 a 90 dias.

Consequentemente, essas considerações determinam a urgência do tratamento em situações críticas. O reestabelecimento do fornecimento de oxigênio e do volume circulante é a primeira prioridade **(O ABC da ressuscitação: vias aéreas *[Airway]*, respiração *[Breathing]* e circulação *[Circulation]*).** A reposição dos fluidos e dos eletrólitos perdidos também é necessária dentro de horas a dias, dependendo do estado do paciente. O suprimento de outros nutrientes se torna importante assim que as medidas de salvamento tenham sido tomadas. Regra geral, os pacientes incapazes de comer precisarão de suporte nutricional se tiverem ficado (ou ficarem) impossibilitados de comer durante mais de sete dias. Esse período é mais curto nas pessoas hipercatabólicas.

A adiponectina aumenta a sensibilidade à insulina. Sua carência leva à resistência à insulina

A adiponectina é uma proteína de 244 aminoácidos com uma homologia estrutural com os colágenos tipo VIII e X e com o fator C1q do complemento. Existem várias formas na circulação: globular, trimérica e de alto peso molecular. A adiponectina estimula a utilização de glicose no músculo e aumenta a oxidação de ácidos graxos no músculo e no fígado, aumentando assim a sensibilidade à insulina. Ela também diminui a produção hepática de glicose. Baixos níveis de adiponectina estão associados à resistência insulínica e à esteatose hepática. A adiponectina regula negativamente a secreção das citocinas pró-inflamatórias interleucinas 6 e 8 (IL-6 e IL-8) e a proteína quimioatratora de monócitos 1 (MCP-1).

O exercício físico aumenta a expressão de adiponectina e regula positivamente seus receptores no músculo esquelético. Por outro lado, sua concentração diminui na obesidade e no diabetes tipo 2. Baixos níveis de adiponectina estão também associados a inflamação leve, estresse oxidativo e disfunção endotelial. Os receptores de adiponectina ativam a AMPK, a proteína cinase ativada por mitógeno p38 e a PPARα, a qual, por sua vez, regula o metabolismo dos ácidos graxos (Cap. 21).

O tecido adiposo secreta citocinas pró-inflamatórias

O tecido adiposo secreta as citocinas pró-inflamatórias fator de necrose tumoral α (TNF-α) e IL-6. O TNF-α é altamente expresso em animais e humanos obesos e também induz resistência à insulina e ao diabetes tipo 2. O TNF-α ativa a via pró-inflamatória do NFκB.

A cinase estimulada por AMP (AMPK) responde aos níveis de energia celulares

A AMPK é uma serina-treonina cinase. É um heterodímero codificado por três genes: ela tem uma subunidade catalítica α e duas subunidades reguladoras, β e γ. É ativada por fosforilação por uma cinase conhecida como LKB1, que é uma molécula supressora tumoral. O ativador-chave da AMPK é o acúmulo celular de 5'-AMP e o aumento da razão 5'-AMP/ATP. Uma elevada razão de creatina/fosfocreatina também ativa a enzima. Altas concentrações de 5'-AMP induzem alterações alostéricas e a fosforilação da subunidade catalítica da AMPK. O AMP é gerado pela reação da miocinase (adenilato cinase):

$$\mathrm{ADP} + \mathrm{ADP} \rightleftharpoons \mathrm{ATP} + \mathrm{AMP}$$

A AMPK estimula vias de produção energética e suprime as de consumo energético

No músculo esquelético, a ativação da AMPK promove o transporte de glicose, a glicólise e a oxidação de ácidos graxos. Por outro lado, ela inibe a síntese de ácidos graxos por fosforilação (e inativação) da acetil-CoA carboxilase. Isso leva a uma diminuição de malonil-CoA, à desinibição da carnitina palmitoil transferase 1 e à consequente facilitação do transporte de ácidos graxos para a mitocôndria. O aumento da oxidação de ácidos graxos evita o acúmulo de lipídios nos tecidos. No fígado, a AMPK inibe a lipogênese e a síntese de colesterol (a última por fosforilação e inativação da HMG-CoA redutase); sua ativação suprime o regulador da proteína de ligação ao elemento de resposta ao esteroide 1c (SREBP1c; Caps. 16 e 18).

No músculo esquelético, a AMPK é ativada durante o exercício e está envolvida no transporte de glicose estimulado pela contração muscular e na oxidação de ácidos graxos (o exercício aumenta a sensibilidade à insulina). No coração, ela é ativada pela isquemia.

A AMPK também atua ao nível hipotalâmico. A expressão da AMPK no hipotálamo reduz a ingestão alimentar. A leptina e a adiponectina estimulam a AMPK no músculo esquelético, no fígado e no tecido adiposo. A insulina e a leptina a inibem no hipotálamo. Fármacos antidiabéticos como as tiazolidinedionas e as biguanidas agem, em parte, por meio da AMPK (Cap. 21). Os efeitos da ativação da AMPK se encontram resumidos na Figura 22.4 (ver também Quadro da página 98).

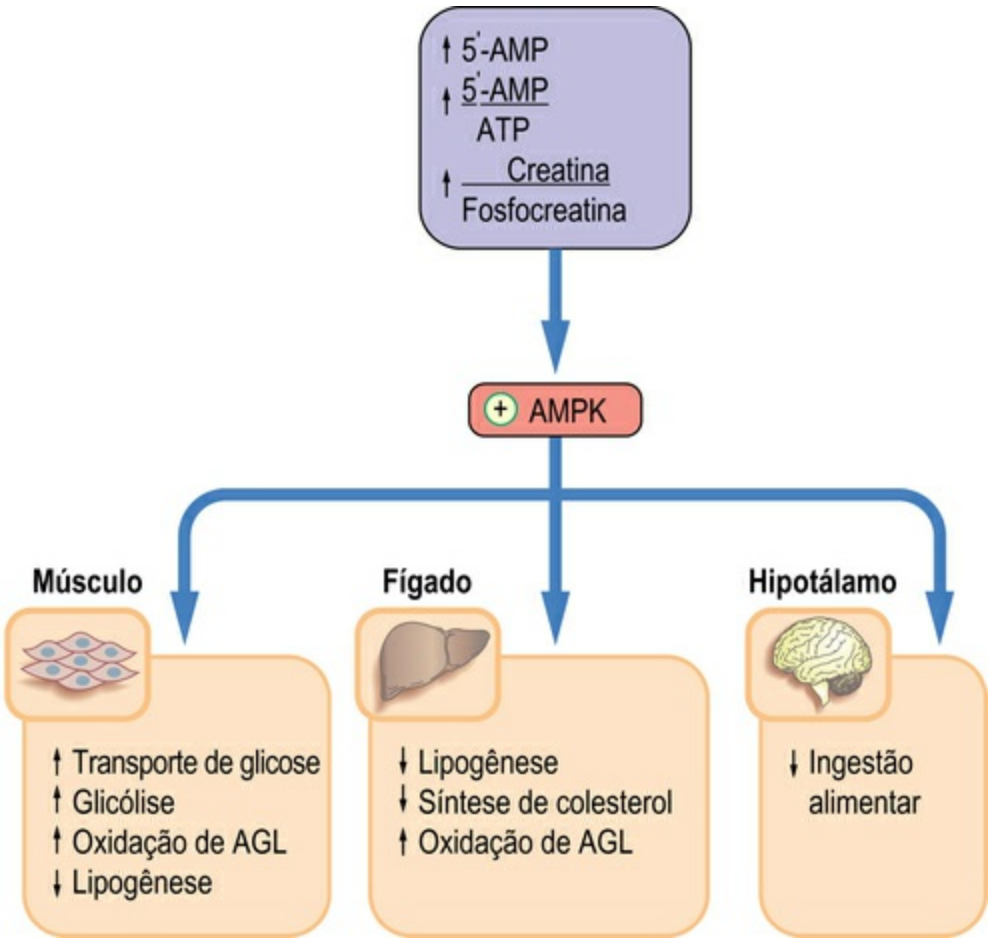


FIG. 22.4 Cinase ativada pelo AMP (AMPK).
A AMPK cumpre o papel de um sensor dos níveis de energia celulares. Seu principal estimulador é o aumento do 5'-AMP. Uma razão 5'-AMP/ATP aumentada sinaliza um baixo nível de energia celular. A AMPK ativada fosforila enzimas limitantes nas vias de produção e utilização de energia. O efeito final é a inibição das vias de utilização energética, como a lipogênese ou a síntese de colesterol, e a estimulação de vias que geram energia: glicólise e oxidação dos AGL. AGL, ácidos graxos livres.

Gasto energético

O gasto energético total diário é o somatório da taxa metabólica basal, do efeito térmico do alimento e da energia consumida durante a atividade física.

O gasto energético pode ser medido por calorimetria direta, que depende de medições de produção de calor. A calorimetria indireta é baseada na medição da taxa de consumo de oxigênio (VO_2). A razão entre VCO_2 e VO_2 é conhecida como taxa de troca respiratória (RER) ou quociente respiratório. Para os carboidratos, RER = 1; para gorduras, RER = 0,7.

A taxa metabólica basal (BMR) é o gasto energético necessário para manter a função corporal em repouso completo

A BMR depende do gênero, da idade e do peso corporal. Em repouso, a energia é necessária para o transporte através das membranas (30% do total), síntese e degradação proteica (30%) e para a manutenção de temperatura, atividade física e crescimento. Certos órgãos utilizam quantidades de energia particularmente grandes: em uma pessoa com 70 kg, o metabolismo cerebral constitui aproximadamente 20% da demanda metabólica basal, o fígado 25% e o músculo 25%. Por outro lado, em bebês com peso

muito baixo ao nascimento, o cérebro é responsável por tanto quanto 60% da BMR, o fígado por 20% e os músculos por apenas 5%.

Na saúde, a atividade física é o componente variável mais importante do gasto energético

O nível de atividade é normalmente expresso como equivalentes metabólicos da tarefa (METs). Os METs usam um valor de referência para o metabolismo em repouso de 1 kcal/kg/h e as atividades são múltiplos deste. Tanto durante o repouso quanto durante a atividade, o metabolismo depende da massa do indivíduo, o que possibilita que a intensidade e o gasto energético possam ser comparados entre pessoas de alturas diferentes (a razão entre o gasto energético durante a atividade e o metabolismo em repouso não será afetada). São dados exemplos de gasto energético associados a diferentes atividades na Tabela 22.1. A necessidade energética também depende do sexo e da idade (Tabela 22.2).

Tabela 22.1
Gasto energético

Taxa de atividade física	Exemplo de atividade
1,3	Assistir televisão, ler, escrever
2,0	Vestir e tirar a roupa, arrumar a cama, caminhar devagar
2,3	Lavar louça, passar roupa
2,5	Tirar o pó e limpar a casa, cozinhar
4,5	Limpar janelas, jogar golfe, carpintaria
6,5	Correr, escavar, cavar
8,0	Subir escadas, andar de bicicleta, jogar futebol, esquiar

O gasto energético é expresso em equivalentes metabólicos da tarefa (METs, isto é, múltiplos do gasto em repouso absoluto).

Tabela 22.2

Necessidades energéticas diárias

EAR, kcal/dia (mJ)		
Idade	**Homens**	**Mulheres**
0-3 meses	545 (2,28)	515 (2,16)
4-6 meses	690 (2,89)	645 (2,69)
4-6 anos	1.715 (7,16)	1.545 (6,46)
15-18 anos	2.755 (11,51)	2.110 (8,83)
19-50 anos	2.550 (10,60)	1.940 (8,10)
75+ anos	2.100 (8,77)	1.810 (7,61)

Necessidades médias estimadas (EAR) de energia para grupos selecionados de gênero e faixa etária. Dados do Dietary Reference Values for Food Energy and Nutrients for the United Kingdom; Boletim do Panel on Dietary Reference Values of the Committee on Medical Aspects of Food Policy, London: TSO 2003.

Nutrigenômica

A resposta individual aos nutrientes é, em grau substancial, determinada pela genética. Os genes influenciam a digestão e a absorção de nutrientes, seu metabolismo e excreção. Percepções como o sabor e a saciedade são também, até certo ponto, geneticamente determinadas. Isso tem consequências nas diretrizes nutricionais: uma vez que o *pool* de genes varia entre populações, as diretrizes nutricionais ótimas devem ser específicas da população, e não gerais. A nutrigenômica tem muitas aplicações potenciais em intervenções nutricionais futuras. Ela é análoga à farmacogenômica: tem como objetivo explorar o conhecimento acumulado pelo Projeto Genoma Humano e a capacidade de monitorar a expressão de um grande número de genes, para conceber tratamentos dietéticos individuais e customizados para um determinado *background* genético. A metabolômica, o monitoramento dos padrões de resposta metabólica aos nutrientes, oferece oportunidades adicionais para determinar os perfis nutricionais individuais (Cap. 36).

O genótipo influencia as concentrações plasmáticas de nutrientes

Um exemplo do efeito do genótipo na ingestão de nutrientes é a resposta da concentração plasmática de colesterol ao seu conteúdo dietético. Aproximadamente 50% da variação individual no colesterol plasmático é geneticamente determinada. A resposta a uma dieta contendo colesterol é associada ao genótipo da apoproteína E (apoE). A apoE é uma proteína sintetizada pelo fígado e é o principal condutor metabólico das partículas remanescentes de lipoproteínas (Cap. 18). Existe em várias isoformas codificadas pelos alelos designados por ε2, ε3 e ε4. Observou-se que a concentração plasmática de colesterol aumenta em dietas com pouca gordura/alto teor em colesterol em pessoas com o fenótipo E4/4, mas não com o fenótipo E2/2.

Existem vários exemplos de nutrientes que afetam a expressão gênica. Por exemplo, as atividades de enzimas hepáticas-chave diferem em pessoas com uma dieta rica em gordura a longo prazo, comparativamente com uma dieta rica em carboidratos. A quantidade de colesterol na dieta afeta a atividade da HMG-CoA redutase. Os ácidos graxos poli-insaturados inibem a expressão da ácido graxo sintase e os ω-3 ácidos graxos (a seguir) reduzem a síntese de RNAm codificante do fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), bem como a citocina inflamatória interleucina 1 (IL-1). Na hipertensão essencial, a sensibilidade ao sal dietético é controlada, pelo menos em algum grau, pelos variantes do gene do angiotensinogênio. Apenas 50% dos pacientes são sensíveis à ingestão de sal: 30-60% da variação da pressão arterial é relacionada com o genótipo.

Regulação genética da ingestão alimentar e do gasto energético

A obesidade é concordante em 74% dos gêmeos monozigóticos e em 32% dos gêmeos dizigóticos. A atual epidemia de obesidade desencadeou uma procura de genes que controlam o gasto energético e a ingestão alimentar. Foram conduzidos grandes estudos populacionais para procurar uma relação entre alterações em genes e o peso corporal. Como existe uma íntima relação entre a massa corporal de membros da mesma família, e especialmente entre gêmeos idênticos, estima-se que 40-70% das diferenças na predisposição para a obesidade possam ser explicadas pela genética.

Demonstrou-se que alterações em dois genes se encontram associadas à obesidade: o da proteína associada à massa adiposa e à obesidade (FTO) e o do receptor da melanocortina-4 (MC4R). A FTO é expressa no núcleo arqueado em resposta à fome, pensando-se, desse modo, que tenha um efeito na massa corporal através do controle da ingestão alimentar. O MC4R é um ligante de melanocortinas que controlam a ingestão alimentar no núcleo arqueado. Estes efeitos foram demonstrados em um estudo no qual os participantes que tinham variações em seu gene FTO associadas à obesidade selecionavam alimentos com maior conteúdo energético de um almoço *buffet*, comparativamente com os participantes que não tinham essas variantes. No entanto, na população geral, as variações no gene FTO e nas regiões próximas dos genes MCR4 explicam apenas um aumento na massa corporal de 0,39 kg/m^2 e de 0,23 kg/m^2, respectivamente; logo, estão longe de explicar a atual epidemia de obesidade. Não foram encontrados genes associados ao gasto energético até então.

Nutrição, ciclo vital e adaptação metabólica

A necessidade de nutrientes é afetada tanto pela fisiologia quanto pela doença. **Gravidez, lactação e crescimento** (em particular, o intenso crescimento no útero, o crescimento durante a infância e o surto de crescimento da adolescência) são os três estados fisiológicos mais importantes associados ao aumento da demanda de nutrientes.

A gravidez é um exemplo de adaptação metabólica chamado de adaptação expansiva

Neste caso, o corpo da mãe se adapta para carregar o feto e lhe fornecer nutrientes. Perto do momento da concepção, o corpo da mãe se prepara para as necessidades metabólicas

do feto. No início da gravidez, a mãe prepara a "capacidade de fornecimento" e, posteriormente na gravidez, esse fornecimento ocorre. Noventa por cento do peso fetal é ganho entre a 20ª e a 40ª semanas de gravidez, e o ganho mais acentuado se estabelece entre a 24ª e a 36ª semanas. A quantidade total de energia armazenada durante a gravidez é de cerca de 70.000 kcal (293.090 kJ), totalizando aproximadamente 10 kg de peso.

A ingestão de nutrientes muda ao longo do ciclo de vida

Após o parto, há uma transição entre a alimentação através da placenta para a amamentação e então, gradualmente, o bebê se adapta à dieta livre. Até o **estágio de amamentação,** a nutrição é controlada por substratos e a criança é completamente dependente da mãe para a nutrição. Posteriormente, o hormônio do crescimento assume um papel principal no direcionamento do desenvolvimento. Na **idade escolar,** novos padrões de alimentação e atividade emergem à medida que a criança aprende a ser independente dos pais. Isso continua durante a **adolescência.** Nesse estágio, os hormônios sexuais começam a ter um papel proeminente no desenvolvimento. Na **vida adulta,** a massa muscular aumenta entre os 20 e os 30 anos, e nesse ponto o nível de atividade física estabiliza. Após isso, a massa muscular começa a declinar e a massa adiposa a aumentar. Isso se acelera após os 60 anos. A massa óssea também diminui com a idade.

Quando há um fornecimento reduzido de nutrientes, tanto pela necessidade nutricional aumentada quanto pela menor disponibilidade do alimento, ocorre a chamada **adaptação redutiva:** a taxa metabólica declina e o desejo de comer diminui. Isso limita a perda de peso.

Principais classes de nutrientes

Os nutrientes principais são os **carboidratos** (incluindo as fibras), **gorduras, proteínas, minerais e vitaminas.** Os carboidratos, proteínas, gorduras, fibras e alguns minerais são macronutrientes. As vitaminas e oligoelementos são **micronutrientes** (Cap. 11). O valor calórico dos principais nutrientes é fornecido na Tabela 22.3. As funções dos nutrientes se encontram resumidas na Figura 22.5.

Tabela 22.3
Conteúdo calórico dos nutrientes

Energia		
Nutriente	**kJ/g**	**kcal/g**
Amido	17	4
Glicose	17	4
Gordura	37	9
Proteína	17	4
Álcool	30	7

Conteúdo calórico dos nutrientes (1 kJ = 239 cal; 1 kcal = 4,184 kJ).

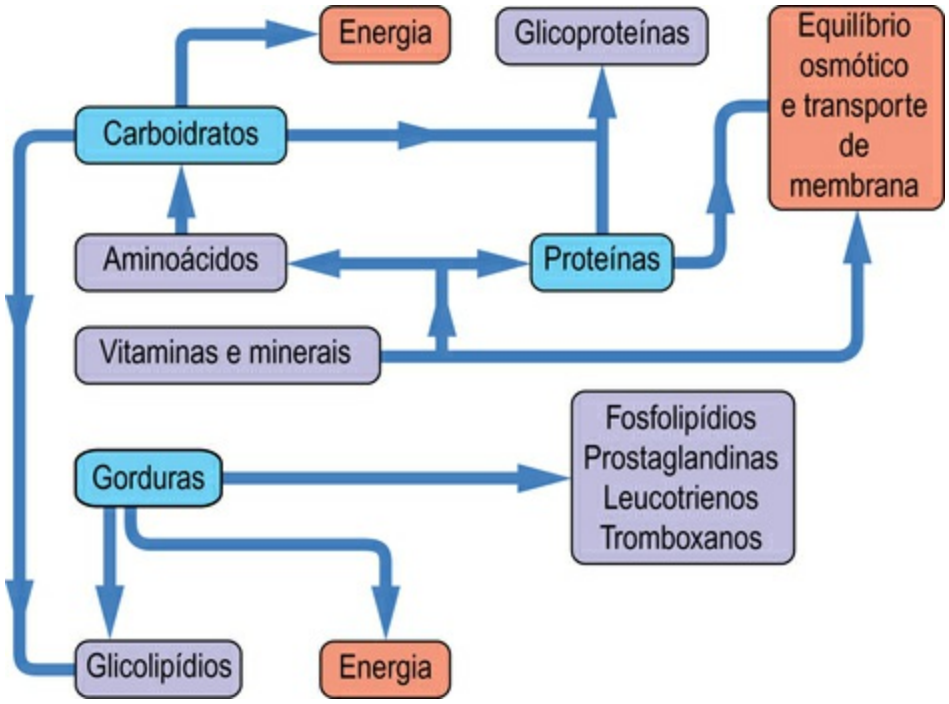


FIG. 22.5 As funções dos nutrientes.
Todas as classes principais de nutrientes podem ser usadas para produzir energia, e todas contribuem para a síntese de compostos mais complexos. O principal papel das vitaminas e dos minerais é a participação em reações enzimáticas, quer como cofatores, quer como componentes de grupos prostéticos enzimáticos.

Carboidratos

Os carboidratos e as gorduras são as **fontes energéticas** mais importantes. Os carboidratos também são precursores das glicoproteínas, glicolipídios e mucopolissacarídios. Os carboidratos da dieta incluem carboidratos refinados, como a sacarose nos doces, bebidas e sucos de fruta, e carboidratos complexos como o amido, presente nos grãos e na batata. As **fibras** são carboidratos indigeríveis para o intestino humano, como a celulose, a hemicelulose, a lignina, a pectina e o β-glucano. As fibras

estão presentes em cereais não processados, legumes, vegetais e frutas. Seu principal papel é regular a motilidade e o trânsito intestinais.

O índice glicêmico e a carga glicêmica fornecem uma noção quantitativa e qualitativa quanto ao manuseamento de alimentos contendo carboidratos

O índice glicêmico (IG) é o sistema de *ranking* dos alimentos contendo carboidratos de acordo com o grau de aumento da glicose sanguínea que ocorre após sua ingestão. O procedimento que serve de base ao *ranking* é similar ao do teste oral de tolerância à glicose. O efeito de uma dose-padrão (25 g ou 50 g) de um alimento particular na concentração plasmática de glicose é testado e comparado ao nutriente de referência (p. ex., glicose). A comparação se baseia na razão entre a área sob a curva (AUC) para o nutriente testado e a glicose.

$$IG = (\text{AUC nutriente testado}/\text{AUC glicose}) \times 100$$

O IG é expresso em uma escala de 1 a 100 (um baixo IG é de 0-55, um moderado é de 56-69 e um elevado é >69). Os alimentos rapidamente absorvidos e digeridos possuem um elevado IG. Uma absorção e uma digestão mais lentas resultam em um menor IG. O IG é afetado pela natureza dos alimentos e pelo tipo de amido, mas também pelo método de confecção (ou seja, o IG de espaguete ligeiramente cozido será inferior ao do cozido durante mais tempo). Os **alimentos de baixo IG** controlam a glicemia e a insulinemia pós-prandiais, são benéficos para as pessoas com diabetes e melhores para o controle de peso. Note que os alimentos de baixo IG tendem a ter elevado teor de gordura e baixo conteúdo de carboidrato e fibra. **(1)**

O derivado do IG é a **carga glicêmica.** Ela traduz a informação qualitativa contida no IG em informação quantitativa, a qual pode ser usada para calcular o conteúdo em carboidratos de uma dada porção de alimento.

$$CG = IG/100 \times CHO\ (\text{gramas por por ç ã o})$$

(2)

Proteínas

As proteínas da dieta são digeridas de seus aminoácidos constituintes. Os **aminoácidos** são então usados como **material para construir as proteínas do próprio organismo.** Eles também servem como substrato energético de "último recurso": o estado catabólico é tipicamente associado à liberação de aminoácidos musculares e, como tal, ao **desgaste muscular.** Devido à diferente composição das proteínas animais e vegetais, não se

alimentar de produtos animais pode levar a deficiências nutricionais como aquelas de vitamina B_{12}, cálcio, ferro e zinco. Da mesma forma que as necessidades energéticas, as necessidades proteicas mudam ao longo da vida (Tabela 22.4). O aumento da demanda de proteínas se encontra associado à gravidez, à lactação e ao surto de crescimento da adolescência.

Tabela 22.4

Necessidades proteicas diárias

Idade	g/dia homens	g/dia mulheres
0-3 meses	12,5	12,5
10-12 meses	14,9	14,9
4-6 anos	19,7	19,7
15-18 anos	55,2	45
19-50 anos	55,5	45
>50 anos	53,3	46,5

As necessidades proteicas são dependentes da idade e do gênero. Aqui são apresentadas as referências de ingestão nutricional (RNI) para grupos etários selecionados. Dados do Dietary Reference Values for Food Energy and Nutrients for the United Kingdom; Boletim do Panel on Dietary Reference Values of the Committee on Medical Aspects of Food Policy, London: TSO 2003.

Gorduras

As gorduras são os nutrientes mais importantes para o **armazenamento energético.** Os lipídios também providenciam isolamento térmico ao organismo. Eles são componentes essenciais das membranas biológicas e servem como substrato para a síntese de glicolipídios, glicoproteínas e também fosfolipídios, prostaglandinas, leucotrienos e tromboxano. Eles são particularmente importantes para o desenvolvimento do cérebro e da retina (Tabela 3.2).

Os ácidos graxos funcionam como **moléculas sinalizadoras** e são ligantes ativadores de fatores de transcrição. Por exemplo, estimulam o acúmulo de diacilglicerol (DAG), ativam a isoforma δ da proteína cinase C (PKC) no fígado, e diminuem a fosforilação de tirosina das proteínas substrato dos receptores de insulina 1 e 2 (IRS-1 e 2). Os ácidos graxos livres (AGL) também estimulam a via do NFκB.

Os ácidos graxos de cadeia longa não são solúveis em água, mas os ácidos graxos de cadeia curta (C4-6) e média (C8-10) o são. Os ácidos graxos de cadeia curta e média são transportados no plasma ligados à albumina, em vez de serem transportados em quilomícrons.

As gorduras são classificadas como saturadas e insaturadas (as últimas são mono- ou poli-insaturadas). O ácido graxo saturado mais comum é o ácido palmítico (C16)

Outros são o esteárico (C18), mirístico (C14) e láurico (C12). Todas as gorduras animais

(gordura da carne, manteiga e banha) são altamente saturadas. As gorduras saturadas estão presentes também no óleo de dendê, manteiga de cacau e óleo de coco.

O ácido oleico (ω-9) é o único ácido graxo monoinsaturado dietético importante

Os ácidos graxos monoinsaturados estão presentes em todas as gorduras animais e vegetais. O azeite (óleo de oliva) é uma fonte particularmente rica de gorduras monoinsaturadas. As gorduras monoinsaturadas *trans* (Fig. 22.6), os isômeros *cis* do ácido oleico, são subprodutos do processo de hidrogenação dos óleos vegetais líquidos. Os ácidos graxos *trans* resultantes da hidrogenação de gorduras estão associados a risco aumentado de doença coronariana.

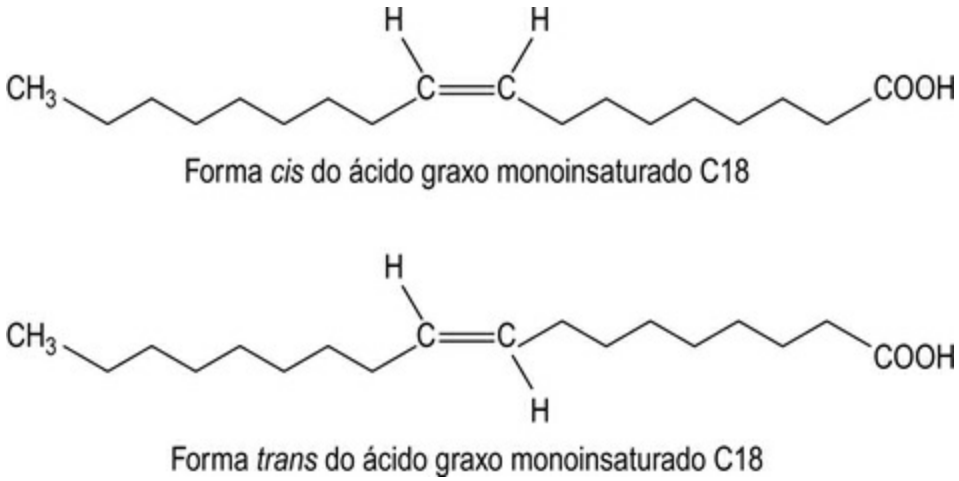


FIG. 22.6 O exemplo do ácido graxo cis- e trans-monoinsaturado (ácido oleico de 18 átomos de carbono).
Os ácidos graxos *trans* são produzidos durante a hidrogenação dos óleos vegetais líquidos.

Os ácidos graxos poli-insaturados incluem os ácidos ω-3 e ω-6

Os **ácidos graxos ω-3** são os ácidos α-linolênico (ω-3, C-18:3, $\Delta^{9,12,15}$), eicosapentanoico (ω-3, C-20:5, $\Delta^{5,8,11,14,17}$) e docosa-hexanoico (ω-3, C-22:6, $\Delta^{4,7,10,13,16,19}$). Eles estão presentes primariamente em peixes, mariscos, fitoplânctons e também em alguns óleos vegetais como os de oliva, açafrão, milho, girassol, soja e vegetais folhosos.

Os **ácidos ω-6** são o ácido araquidônico (ω-6, C-20:4, $\Delta^{5,8,11,14}$) e seu precursor, o ácido linoleico (ω-6, C-18:2, $\Delta^{9,12}$). Os ácidos graxos ω-6 estão presentes em óleos de soja e de canola e em óleos de peixe (particularmente de peixes gordurosos como o salmão e as sardinhas).

Definições na ciência nutricional

A **dieta** é o total de todos os alimentos sólidos e líquidos ingeridos por um indivíduo. O **alimento ou comida** é o alimento particular que é ingerido. Os **nutrientes** são componentes quimicamente definidos dos alimentos necessários ao organismo.

Não é fácil avaliar a ingestão alimentar

Os dados disponíveis são baseados em questionários populacionais (por vezes incompletos). Conjuntos de valores provenientes dessas pesquisas descrevem a ingestão mínima, média e adequada sugerida para nutrientes em particular. São usados valores diferentes em países diferentes e tem havido alguma confusão e sobreposição entre várias definições (Quadro na página 305). Atualmente, as estimativas de ingestão de nutrientes são baseadas nas referências de ingestão dietéticas (DRI), desenvolvidas pelo Food and Nutrition Board (FNB) no Institute of Medicine (IOM) das National Academies nos Estados Unidos. Eles constituem os conjuntos de valores que descrevem a ingestão de um dado nutriente em uma população (Fig. 22.7).

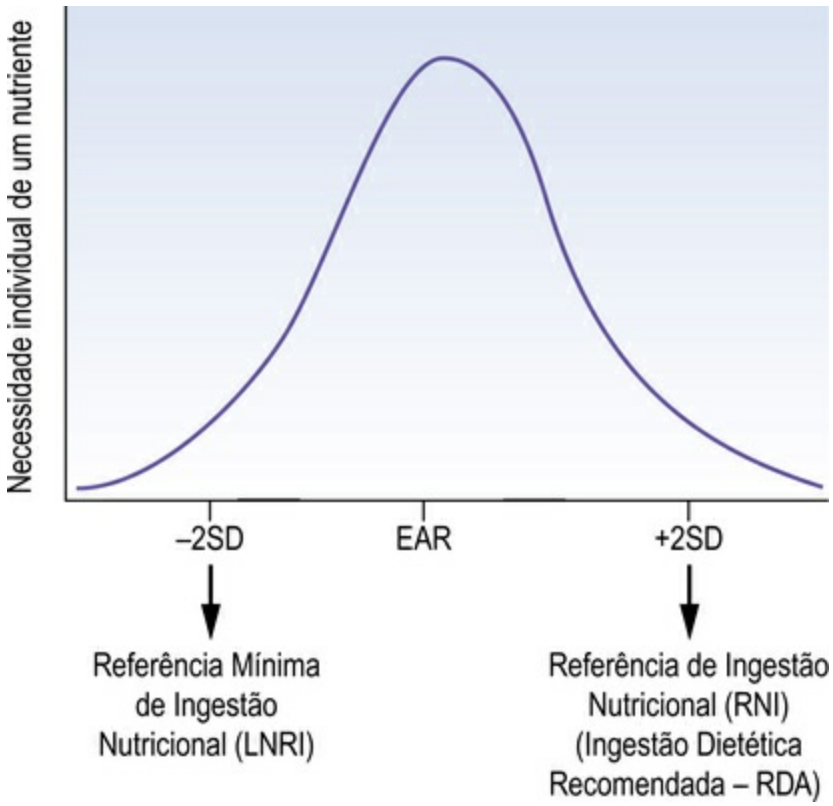


FIG. 22.7 Referências de ingestão dietética (RDA): os valores dos componentes. Enquanto a Necessidade Média Estimada (EAR) reflete a ingestão adequada para metade da população, a RNI (ou RDA) são valores que representam a ingestão adequada para a grande maioria dos indivíduos. SD, desvio-padrão.

Nutrientes essenciais (limitantes)

Os nutrientes essenciais não podem ser sintetizados no corpo humano e, como tal, precisam ser suplementados a partir do exterior. Eles incluem:

- aminoácidos essenciais
- ácidos graxos essenciais (EFA)
- algumas vitaminas e oligoelementos



Quadro clínico

Uma mulher com falha renal e perda de peso

Uma mulher com 59 anos foi admitida na unidade renal com infecções e endocardite recorrentes. Ela havia sido tratada com hemodiálise por cinco anos e, durante um período de dois anos, perdeu 33% de seu peso corporal. Apresentava muito pouco apetite e consumia dois pacotes de batido substituto de refeição (1,5 kcal/mL e 6,2 kJ/mL) por dia. Estava anúrica e sua ingestão de líquidos era restrita a 1.000 mL diários. Sua altura era de 1,68 m e ela pesava 52,7 kg; o IMC era de 18. Seus resultados bioquímicos mais recentes revelavam hipercalemia entre 5,7 e 6,2 mmol/L.

Comentário

Devido a seu pobre estado nutricional e contínua perda de peso, ela precisa continuar a ingerir suplementos nutricionais para minimizar perdas de peso adicionais. No entanto, por causa da hipercalemia, deve ser considerada uma porção alimentar pobre em eletrólitos. Ela estava ingerindo inicialmente 22 mmol de potássio no batido de 1,5 kcal/mL. Subsequentemente, este foi substituído por uma porção pobre em eletrólitos, que fornecia 12 mmol no total. O Renal Nutrition Group Standards do Reino Unido recomenda que a ingestão diária de potássio em pacientes deste tipo seja inferior a 1 mmol/kg de peso corporal. Substitutos alimentares com uma baixa razão eletrólitos/volume devem sempre ser considerados para pacientes renais, e as concentrações séricas de eletrólitos devem sempre ser rigorosamente monitoradas.

Note que os carboidratos não são nutrientes essenciais.

Algumas proteínas vegetais são relativamente deficientes em aminoácidos essenciais, enquanto as proteínas animais normalmente contêm uma mistura balanceada

Os aminoácidos essenciais são a fenilalanina (a tirosina pode ser sintetizada a partir da fenilalanina), os aminoácidos de cadeia ramificada valina, leucina, isoleucina e treonina, e a metionina e lisina (Cap. 19).

Os ácidos graxos essenciais (EFA) são o ácido linoleico e α-linolênico

O ácido araquidônico, o ácido eicosapentanoico e o ácido docosa-hexanoico podem ser produzidos em quantidades limitadas a partir dos EFA; porém, eles se tornam nutrientes essenciais quando os EFA estão deficitários.

As vitaminas e os oligoelementos são importantes para a catálise de reações químicas

Eles atuam como coenzimas e formam grupos prostéticos funcionalmente importantes de enzimas. São discutidos em mais detalhe no Capítulo 11.

Avaliação do estado nutricional

Tal avaliação inclui hábitos dietéticos e histórico dietético, um conjunto de medições

corporais (antropométricas) e testes laboratoriais bioquímicos e hematológicos. Dado que não existe um marcador definitivo e único do estado nutricional, a avaliação depende da interpretação de um leque de variáveis.

O histórico dietético deve incluir mais do que os detalhes da ingestão alimentar

Os hábitos dietéticos incluem padrões de refeições e a quantidade e composição dos alimentos. A dieta individual é determinada por fatores biológicos, psicológicos, sociológicos e culturais. Os fatores biológicos envolvidos são o estado dos sistemas responsáveis pela ingestão, digestão, absorção e metabolismo de nutrientes. Deficiências enzimáticas, como, por exemplo, a da lactase (Cap. 10), causam o comprometimento da absorção de alimentos (nesse caso, do leite).

Coleta do histórico dietético

Os fatores psicológicos desempenham um papel importante na determinação da ingestão alimentar; os distúrbios alimentares, como a anorexia nervosa e a bulimia nervosa, podem levar à desnutrição severa. Os fatores sociológicos incluem a disponibilidade e o preço dos alimentos e as medidas tomadas pela sociedade para melhorar as dietas como, por exemplo, refeições escolares ou refeições subsidiadas para pessoas idosas ou portadoras de deficiência. Os fatores culturais também determinam os padrões alimentares e o tipo de gêneros alimentícios preferidos. Todos os fatores anteriores são importantes quando da coleta do histórico nutricional/dietético. A ingestão alimentar individual pode ser avaliada por questionários de frequência alimentar, recordação dietética de 24 horas, registros alimentares e também pela análise direta de alimentos e por estudos de balanço metabólico. O método mais recente de pesquisa dietética é a chamada avaliação estruturada dos padrões dietéticos.

Peso corporal e índice de massa corporal

O peso corporal em relação à altura é a medida mais comumente usada na avaliação nutricional. A relação entre ambos é expressa como o índice de massa corporal (IMC), calculado de acordo com a fórmula:

$$\text{IMC} = \text{peso (kg)}/\text{altura (cm)}^2 \quad \textbf{(3)}$$

O IMC é usado para categorizar o estado nutricional, como apresentado na Tabela 22.5. Como mencionado anteriormente, ele não deve ser utilizado como indicador único/definitivo do estado nutricional.

Tabela 22.5

Índice de massa corporal (IMC) e estado nutricional

IMC (kg/m^2)	Interpretação
<18,5	Desnutrido
18,5-20	Abaixo do peso
21-25	Desejável
26-30	Sobrepeso
>30	Obeso

Outras medidas usadas na avaliação nutricional são a **relação cintura-quadril,** a **circunferência do antebraço** e a **espessura da pele,** medida por um paquímetro devidamente calibrado. A simples medição da circunferência da cintura se correlaciona com a quantidade de gordura visceral e é usada no diagnóstico da síndrome metabólica (Cap. 21). Análises mais detalhadas incluem a avaliação da água corporal total, análise da impedância bioelétrica corporal e a medição da massa magra corporal utilizando a absorciometria de raios X de dupla energia (DEXA). Algumas dessas medições permitem o cálculo de variáveis, como o conteúdo de gordura e a composição corporais. Medições funcionais, como a força de preensão ou o pico de fluxo expiratório, também são relevantes para a avaliação nutricional.

Marcadores bioquímicos do estado nutricional

A excreção urinária de nitrogênio ajuda a avaliar o balanço de nitrogênio

O balanço de nitrogênio se relaciona com as necessidades corporais de proteína. É a diferença entre a ingestão de nitrogênio e sua excreção. O balanço de nitrogênio positivo significa que a ingestão excedeu a perda. O balanço de nitrogênio negativo significa que a perda excede a ingestão. A excreção urinária de nitrogênio durante 24 horas é uma estimativa da quantidade de proteínas metabolizadas pelo corpo. Noventa por cento do nitrogênio excretado aparece na urina (80% destes como ureia). O resto é excretado nas fezes, cabelo e suor. A excreção de nitrogênio se ajusta à ingestão proteica dentro de dois a quatro dias. As medições da excreção do nitrogênio (ou ureia) urinário são a maneira mais fiável de avaliar as necessidades proteicas diárias. Atualmente, são raramente utilizadas fora do ambiente de pesquisa. Como um guia, a maioria das pessoas necessita de 1-1,2 g proteína/kg de peso corporal/dia. As necessidades proteicas relacionadas com a idade estão listadas na Tabela 22.4.

Proteínas plasmáticas específicas têm sido usadas como marcadores do estado nutricional

A concentração de uma proteína no plasma pode refletir o estado nutricional durante o período de tempo relacionado com sua meia-vida. As proteínas mais comumente

utilizadas com esse fim são a **albumina** e a **transtirretina** (pré-albumina). Muitos estudos confirmam a ligação entre a síntese de albumina no fígado (a meia-vida da albumina é de aproximadamente 20 dias [Cap. 4]) e o estado nutricional. A transtirretina, que tem uma meia-vida de dois dias, também tem sido utilizada na avaliação nutricional. Ela é sintetizada no fígado e forma um complexo com a proteína de ligação ao retinal no plasma.

Infelizmente, a interpretação das concentrações plasmáticas das proteínas nutricionalmente relevantes é com frequência difícil, porque elas não são determinadas pelo estado nutricional em exclusivo. Por exemplo, a concentração plasmática de albumina também depende do estado de **hidratação:** ela diminui em pacientes hiper-hidratados (Cap. 24). Além disso, a albumina e a transtirretina são afetadas pela **resposta de fase aguda** (a concentração de transtirretina aumenta durante a reação de fase aguda e a concentração de albumina diminui). Desse modo, em pacientes críticos, a albumina não é um marcador útil do estado nutricional.

Testes laboratoriais gerais fornecem informações suplementares à avaliação nutricional

A medição da hemoglobina pode revelar uma deficiência de ferro. A avaliação da função hepática (Cap. 30) e renal (Cap. 23), as medições de sódio, potássio, cloreto, bicarbonato, cálcio, fosfato e magnésio séricos, assim como a avaliação do metabolismo de ferro, fornecem informações adicionais úteis. A avaliação da ingestão e da perda de líquido diárias (Cap. 24) é essencial em pacientes que estão sendo considerados para o suporte nutricional.

A avaliação total envolve medições de vitaminas e oligoelementos

Isso é particularmente importante em pacientes que permanecem em nutrição parenteral a longo prazo.

Avaliação simplificada do estado nutricional

A Ferramenta de Rastreio Universal da Desnutrição (do inglês, *Malnutrition Universal Screening Tool*, MUST), foi introduzida pela Associação Britânica para a Nutrição Parenteral e Enteral (do inglês, British Association for Parenteral and Enteral Nutrition, BAPEN) para possibilitar a rápida avaliação do estado nutricional em adultos. É um método com cinco passos para a identificação de indivíduos em risco (Fig. 22.8).

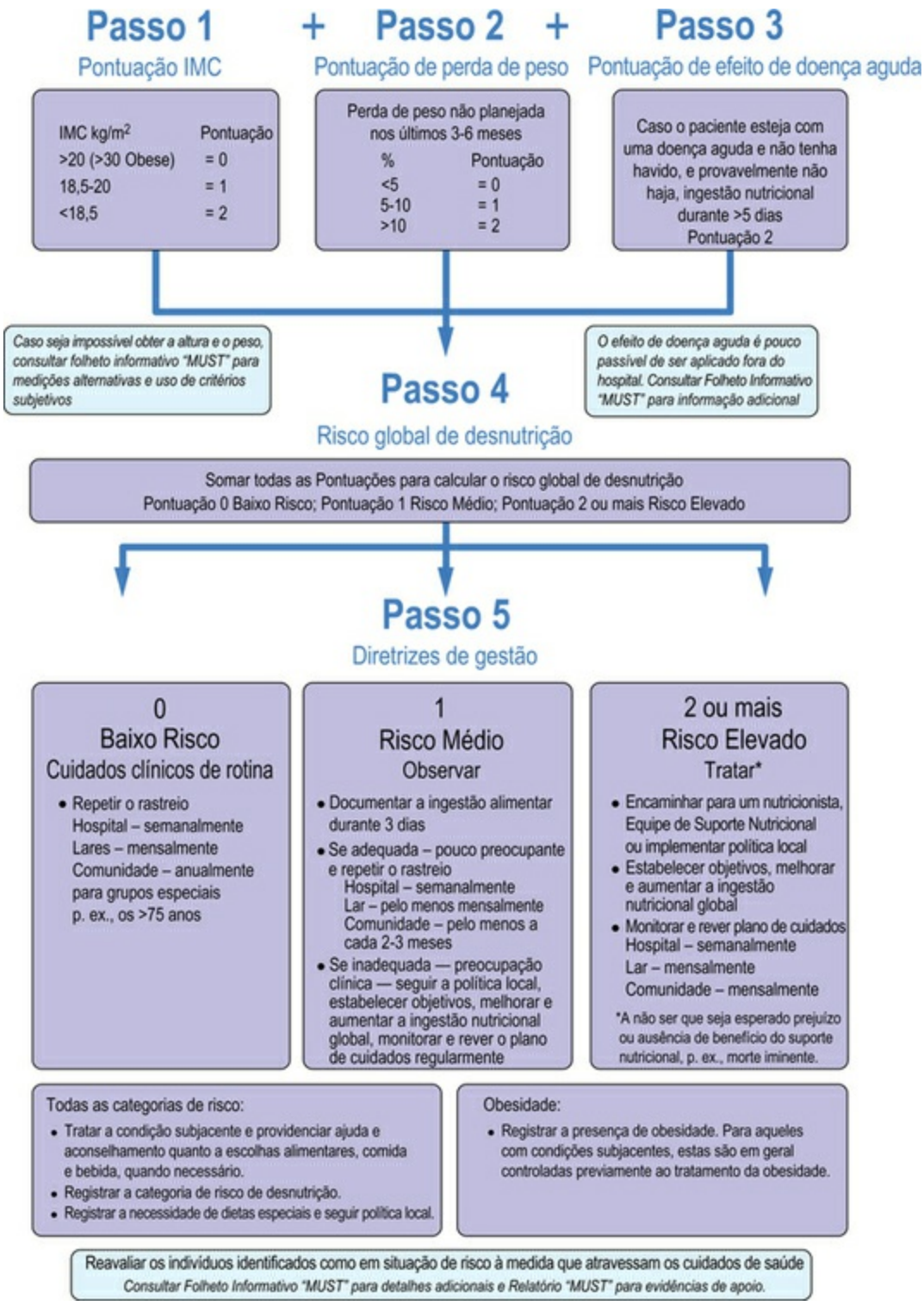


FIG. 22.8 Ferramenta de Rastreio Universal da Desnutrição (do inglês, Malnutrition Universal Screening Tool, MUST), desenvolvida pela Associação Britânica para a Nutrição Enteral e Parenteral. Passos envolvidos na avaliação nutricional. (Reproduzido com permissão de www.Bapen.org.uk). Consulte o *site* da BAPEN para informação adicional.

Desnutrição

A desnutrição é um declínio gradual no estado nutricional que, em estados mais avançados, leva a um decréscimo na capacidade funcional e a outras complicações

A desnutrição energética proteica (do inglês, *protein energy malnutrition,* PEM) é definida como um estado nutricional pobre devido à ingestão inadequada de nutrientes.

A ingestão reduzida de alimentos leva a uma adaptação redutiva, que inclui um decréscimo nas reservas de nutrientes, alterações na composição corporal e o uso mais eficiente de combustíveis, tal como o uso de corpos cetônicos pelo cérebro (as mudanças metabólicas que acompanham o jejum são descritas no Capítulo 21).

A desnutrição é uma das questões-chave enfrentadas pela saúde pública nos países em desenvolvimento e precisa ser vista não só de uma perspectiva médica, mas também das perspectivas social e econômica. A mortalidade em pacientes subnutridos (IMC entre 10 e 13) é quatro vezes superior quando comparada à de pessoas bem nutridas. Os efeitos da desnutrição são resumidos na Tabela 22.6. Em todo o mundo, a desnutrição contribui com 54% dos 11,6 milhões de mortes anuais entre crianças com menos de 5 anos.

Tabela 22.6

Consequências da desnutrição calórico-proteica

Síntese proteica diminuída
Atividade de Na^+/K^+-ATPase diminuída
Transporte de glicose diminuído
Esteatose hepática, necrose hepática, fibrose hepática
Depressão, apatia, perturbações de humor
Hipotermia
Ventilação comprometida
Sistema imune comprometido: cicatrização afetada
Risco de não cicatrização
Débito cardíaco reduzido
Função renal diminuída
Perda de força muscular
Anorexia
Mobilidade reduzida

Nos países desenvolvidos, a desnutrição é um problema em pacientes hospitalizados que são incapazes de se alimentar devido ao seu problema primário: por exemplo, acidente vascular ou câncer. Os problemas gastrintestinais, particularmente a patologia do cólon e a doença celíaca (Cap. 10), ou o estado pós-operatório, estão associados a problemas nutricionais específicos. A desnutrição também afeta um vasto grupo de indivíduos de idade mais avançada.

No Reino Unido, 25-34% das pessoas admitidas nos hospitais correm risco de desnutrição e 20-40% dos pacientes críticos têm evidências de desnutrição energética proteica. A desnutrição está associada a morbidade e mortalidade aumentadas, com permanências mais prolongadas no hospital e taxa de complicações aumentada. Além da

desnutrição, podem ocorrer deficiências específicas como as da vitamina D, ferro e vitamina C.

Marcadores da desnutrição

IMC inferiores a 18,5 kg/m^2 sugerem risco significativo de desnutrição, assim como a perda não intencional de 10% do peso corporal nos 3-6 meses precedentes. No decurso da doença aguda, a incapacidade de se alimentar por mais de cinco dias configura o risco.

Existem dois tipos de desnutrição proteico-calórica: o marasmo e o kwashiorkor

O **marasmo** é o resultado de uma ingestão inadequada prolongada de calorias e proteína. É uma condição crônica, que se desenvolve ao longo de meses ou anos. É caracterizado por perda do tecido muscular e de gordura subcutânea, com preservação da síntese de proteínas viscerais, como a albumina. Há uma clara perda de peso.

O **kwashiorkor** é uma forma mais aguda de subnutrição, que pode também ocorrer de modo subjacente ao marasmo. Também se desenvolve em função da ingestão nutricional inadequada após trauma ou infecção. No kwashiorkor, ao contrário do marasmo, os tecidos viscerais não são poupados: a marca registrada do kwashiorkor é o edema devido à baixa concentração de albumina plasmática e à perda de pressão oncótica (Cap. 24). O edema pode mascarar a perda de peso. As complicações do kwashiorkor são desidratação, hipoglicemia, hipotermia, distúrbios eletrolíticos e septicemia. Estes pacientes têm sua imunidade e cicatrização comprometidas, e são suscetíveis a infecção.

A classificação de desnutrição da OMS é baseada na antropometria e na presença de edema depressível bilateral. Outra classificação foi proposta, a qual distingue desnutrição com complicações daquela sem complicações (Tabela 22.7). O marasmo e o kwashiorkor são termos raramente usados na prática hospitalar em países desenvolvidos; **desnutrição** e **desnutrição com complicações** são provavelmente mais apropriados.

Tabela 22.7
Classificação da desnutrição

	Moderada	Severa	Complicada
Peso por altura (% da média)	70-80	<70	<80
– ou edema depressível	Não	Sim	Sim
– ou circunferência da parte média superior do braço	110-125	<110 mm	<110 mm
Apetite, clinicamente bem, alerta	Sim	Sim	Não*

Note que na classificação clássica da desnutrição a presença de edema é também a principal característica de diferenciação entre o marasmo e o kwashiorkor.

*Os pacientes com desnutrição complicada podem desenvolver anorexia, febre alta, anemia e desidratação.

De acordo com Colins S, Yates R: The need to upgrade the classification of acute malnutrition. Lancet 362:249, 2003.

A síndrome de realimentação se desenvolve como consequência da alimentação

inapropriada de uma pessoa desnutrida

O tratamento de pacientes internados com desnutrição em áreas afetadas pela fome inclui preparações-padrão, como o leite terapêutico Fórmula 100 (F100). A F100 é uma dieta líquida com conteúdo energético de 100 kcal/100 mL. Ela inclui leite desnatado em pó, óleo, açúcar e uma mistura de vitaminas e minerais (sem ferro). Nas áreas em que há fome, os programas comunitários de alimentação usam as chamadas rações gerais de sobrevivência (pelo menos 2.100 kcal; 8.786 kJ/dia) contendo grãos, legumes e óleo vegetal. Durante o tratamento da desnutrição, isso precisa ser combinado com o fornecimento adequado de água, saneamento e cuidados de saúde básicos.

É importante dispor de tempo para tratar nutricionalmente uma pessoa desnutrida. A reposição muito rápida pode ser perigosa, devido à possibilidade de uma mudança relevante entre os fluidos intracelular e extracelular. Isso é conhecido como **síndrome de realimentação** e é caracterizado por uma grave diminuição das concentrações séricas de magnésio, fosfato e potássio (o último em virtude da estimulação da secreção de insulina). Igualmente, se estiver presente uma deficiência de tiamina, a alimentação com carboidratos pode desencadear a **síndrome de Wernicke-Korsakoff** (Cap. 11). Refeições simples e frequentes, em intervalos curtos de tempo, são recomendadas durante a recuperação da fome e, em contexto hospitalar, a introdução gradual do suporte nutricional e o monitoramento atento são requeridos.



Quadro clínico

Homem obeso com diabetes tipo 2, doença coronariana e artrite

O senhor K é um homem de 55 anos, com diabetes tipo 2 e doença coronariana. Ele sofre de angina de esforço e de dor artrítica intensa no joelho. Quando ele se apresentou inicialmente no ambulatório, seu peso era de 140 kg e sua altura de 1,80 m (IMC de 43). No intervalo de um ano, ele conseguiu perder 12 kg, com dieta. Foi--lhe prescrito um inibidor de lipase, que tolerou bem. Porém, sua artrite piorou e ele se tornou progressivamente menos capaz de fazer exercício. Como resultado, seu peso aumentou novamente para 137 kg. O paciente foi encaminhado para a equipe cirúrgica e está agora sendo considerado para cirurgia para colocação de banda gástrica.

Comentário

Este paciente ilustra múltiplos problemas associados à obesidade e, em particular, como uma doença concomitante pode interferir nos programas de redução de peso. A perda de peso é, em grau substancial, dependente do nível de exercício. O paciente perdeu peso inicialmente, mas a manutenção do menor peso corporal foi comprometida pela mobilidade reduzida causada pela artrite.

Suporte nutricional

O suporte nutricional é necessário em um número substancial de pacientes

hospitalizados e varia da assistência simples com refeições, dietas enriquecidas ou com consistência especial à nutrição enteral ou parenteral total (Tabela 22.8).

Tabela 22.8

Formas de suporte nutricional

Dietas especiais
Assistência à alimentação
Nutrição enteral (alimentação através de diferentes sondas de alimentação: nasogástrica, nasoduodenal; gastrectomia e jejunostomia)
Nutrição parenteral (intravenosa)

A nutrição enteral consiste em alimentar uma pessoa através de tubos especiais colocados no estômago ou no jejuno

A nutrição enteral é apropriada quando existem dificuldades na ingestão oral do alimento, mas o trato gastrintestinal funciona devidamente. Os alimentos enterais-padrão contêm carboidratos, proteína, gordura, água, eletrólitos, vitaminas e minerais, incluindo oligoelementos. Os alimentos pré-digeridos contêm peptídios curtos ou aminoácidos livres.

Quando o trato gastrintestinal não funciona, por exemplo, por obstrução intestinal, ou quando grandes porções suas foram removidas cirurgicamente, a nutrição parenteral total é apropriada

A nutrição parenteral significa **alimentação intravenosa.** As soluções de nutrição parenteral contêm fluidos, glicose (dextrose), aminoácidos e gorduras, fornecidos sob a forma de emulsão lipídica (nos Estados Unidos, derivadas de óleo de soja; e na Europa, também de óleo de peixe, óleo de oliva e triglicerídios de cadeia média). Vitaminas, minerais e eletrólitos também são incluídos. A nutrição parenteral total, embora em muitos casos salve vidas, é um tratamento potencialmente associado a complicações causadas por infecções intravenosas (exige procedimentos estritamente estéreis), bem como a problemas metabólicos. Por essa razão, o tratamento nutricional parenteral em hospitais é gerido por equipes multidisciplinares que incluem enfermeiros, cirurgiões, gastroenterologistas, nutricionistas, farmacêuticos e médicos de medicina laboratorial especializados.

Obesidade

A obesidade emergiu como um problema de saúde mundialmente relevante

Em todo o mundo, a obesidade aumentou mais de 70% desde 1980. Nos Estados Unidos, 35,7% dos adultos e 16,9% das crianças são obesos (US National Health and Nutrition Examination Survey 2009). As principais causas disto parecem ser a ampla disponibilidade de alimentos altamente calóricos e a redução da atividade física tanto no trabalho quanto no tempo livre.

A obesidade está associada a um risco aumentado de problemas médicos e cirúrgicos

A obesidade está associada a um risco aumentado de doenças em todos os sistemas do organismo (Tabela 22.9). Em particular, é um fator de risco para diabetes melito tipo 2 (Cap. 21); o aumento da incidência mundial de diabetes acompanha o aumento da obesidade. A resistência à insulina, que se desenvolve na obesidade, é um importante denominador comum entre a obesidade e o diabetes. A obesidade e a resistência à insulina acarretam um risco aumentado de doença cardiovascular.

Tabela 22.9

Riscos de saúde associados à obesidade

Sistema	Condições associadas à obesidade
Cardiovascular	Doença cardíaca coronariana Flebite/ulceração venosa Elevada pressão sanguínea Colesterol plasmático elevado
Endócrino	Diabetes tipo 2 Síndrome do ovário policístico Infertilidade
Gastrintestinal	Esteatose hepática não alcoólica Refluxo esofágico Câncer esofágico Cálculos biliares Câncer hepatocelular
Respiratório	Apneia obstrutiva do sono Asma
Sistema nervoso central	Hipertensão intracraniana idiopática Derrame
Locomotor	Osteoartrite Gota
Genitourinário	Câncer cervical Câncer do endométrio Câncer renal Câncer da próstata
Outros	Câncer de mama Cataratas Psoríase Complicações da gravidez

Apostando na perda de peso para reverter as consequências da obesidade

A perda de peso aumenta a esperança de vida, diminui a pressão arterial, reduz a deposição de gordura visceral, melhora as concentrações plasmáticas de lipídios, aumenta a sensibilidade à insulina e normaliza a glicemia, melhora a coagulação e a função plaquetária e otimiza a qualidade de vida.

Para perder peso, há que alterar o equilíbrio entre a ingestão alimentar e o gasto, ou seja, entre a ingestão alimentar e a atividade física

No entanto, o processo envolve muitos outros fatores, como motivação, tempo disponível, custo e acesso a programas apropriados de redução de peso. As dietas pouco calóricas contêm aproximadamente 1.200-1.300 kcal/dia e as dietas muito pouco calóricas contêm aproximadamente 800 kcal/dia. Geralmente, uma combinação de **dieta** e **exercício** com **intervenções comportamentais** (p. ex., estabelecimento de objetivos, prevenção de recaídas) é mais efetiva na indução da perda de peso do que a dieta isolada. No entanto, atualmente não existem intervenções baseadas na evidência de que consigam induzir uma perda de peso superior a 5% do peso corporal e mantê-la a longo prazo, além dos **tratamentos cirúrgicos** (cirurgia bariátrica).



Quadro clínico

Um homem de 46 anos com hipertrigliceridemia e esteatose hepática

O senhor A é um homem de 46 anos, de descendência sul-asiática. Recentemente, começou a ganhar peso — "a engorda da meia-idade", como ele a chama. Esse ganho de peso está concentrado em seu abdome. Sua esposa está preocupada, uma vez que seu pai teve diabetes tipo 2 e morreu na sequência de um ataque cardíaco aos 60 anos, e insiste que ele vá ao médico para um *check-up*. Ele vai ao médico e são colhidas amostras de sangue, as quais revelam colesterol total moderadamente elevado, elevada concentração de triglicerídios e baixa concentração de colesterol HDL (Cap. 18). Há glicose em jejum alterada e seus testes de função hepática demonstram uma pequena elevação em suas transaminases. O ultrassom hepático é consistente com deposição intra-hepática de gorduras (esteatose hepática).

Comentário

A combinação de gênero, etnia e história familiar do senhor A o predispôs para ganhar peso centralmente, e não subcutaneamente e de modo uniforme, por todo o seu corpo. Essa obesidade central se deve à presença de gordura em sua cavidade abdominal, conhecida como gordura visceral. Essa gordura se deposita em torno de seu fígado e pâncreas, e aumenta o risco de ele desenvolver diabetes tipo 2. Sua glicose plasmática está aumentada, mas ele não se encontra ainda no nível classificado como diabetes (Cap. 21). Existe algum grau de inflamação em seu fígado devido à camada de gordura que o atravessa, e, embora raro, isso pode levar a cirrose hepática em algumas pessoas. Seu perfil de colesterol está em consonância com a resistência à insulina; isso é

maioritariamente devido à deposição ectópica de triglicerídios no músculo e no fígado.

Dietas pobres em carboidratos para redução de peso

Dietas pobres em carboidratos e ricas em lipídios aparentam ser efetivas na redução de peso, pelo menos a curto prazo, e reduzem consistentemente as concentrações plasmáticas de glicose. Como em muitos outros aspectos da gestão dietética, elas não são completamente baseadas na evidência. Há preocupações persistentes que incluem o risco potencial de anormalidades das funções hepática e renal, assim como os efeitos a longo prazo do aumento da ingestão de gorduras sobre o risco cardiovascular. A pesquisa sobre o tema continua.

O tratamento cirúrgico da obesidade resulta em grandes perdas de peso

A cirurgia bariátrica inclui a **cirurgia de *bypass* gástrico,** na qual o tamanho do estômago é reduzido e a porção inicial do intestino delgado é sujeita a *bypass,* e a **banda gástrica,** na qual uma banda é inflada em torno da parte do estômago. A cirurgia pode resultar em uma perda de peso de 20% e demonstrou reduzir o risco futuro de doença cardiovascular e de cânceres, bem como melhorar a saúde mental e o bem-estar geral. Pode ter um efeito de tal forma profundo no controle glicêmico que os pacientes com diabetes atingem concentrações sanguíneas de glicose bem abaixo do limite no qual o diabetes é diagnosticado.

Alimentação saudável e prevenção dietética da doença

As recomendações dietéticas atuais para a população geral focam a alimentação equilibrada

As recomendações atuais salientam a **dieta equilibrada.** Recomendam inequivocamente uma elevada ingestão de frutas e vegetais. Os alimentos ricos em amido constituem outra parte importante da dieta. Relativamente aos carboidratos, os grãos integrais são provavelmente o tipo de alimento mais saudável (ao contrário, por exemplo, do pão branco ou arroz branco). A ingestão de produtos lácteos é recomendada com moderação. Peixe, aves, feijões e frutos secos são vistos como fontes saudáveis de proteínas e são preferidos em relação às carnes vermelhas. No que concerne à gordura, óleos vegetais para confecção (azeite e óleo de canola) são percepcionados como gorduras saudáveis, ao contrário das gorduras saturadas e, particularmente, as gorduras *trans*. A dieta deve ter um baixo teor de carboidratos não refinados, gordura saturada e colesterol. É recomendada a restrição de açúcar e de adoçantes calóricos, assim como a restrição de sódio e a moderação no consumo de álcool. Uma dieta saudável deve ser combinada com um **estilo de vida ativo.**



Quadro clínico

Homem de 46 anos com hipertrigliceridemia e esteatose hepática: os benefícios da perda de peso

O senhor A está preocupado com a história de diabetes tipo 2 e de doença cardiovascular de seu pai. Decide tentar perder peso. Ele pensa cuidadosamente sobre aquilo que estará errado em sua dieta e reconhece que petiscar bolachas de chocolate e beber bebidas açucaradas à noite são sua maior fraqueza. Decide que a melhor opção é não comprar nenhum desses lanches no supermercado, de forma a evitar a tentação. Decide igualmente se inscrever em uma academia e frequentar uma aula de circuito duas vezes por semana. Após seis meses desse regime, ele perdeu 7 kg, se sente bem e aprecia seu novo estilo de vida. Retorna ao médico para reavaliar seus parâmetros sanguíneos. Seus testes de função hepática voltaram aos limites normais. No entanto, embora seus triglicerídios estejam também mais baixos, permanecem elevados, e seu colesterol HDL está ainda baixo. Sua glicose sanguínea está mais baixa do que anteriormente, mas ainda é classificada como alterada. O senhor A está aborrecido por seus resultados não terem se normalizado e sente que seus esforços foram em vão.

Comentário

O senhor A procedeu corretamente ao perder 7 kg. Quando uma pessoa com excesso de gordura visceral perde peso, é essa gordura visceral que é primeiramente perdida; essa é a razão pela qual os testes de função hepática do senhor A melhoraram, uma vez que o fígado já não se encontra "irritado" pela deposição de gordura. Contudo, a obesidade é somente um componente do risco: no caso do senhor A, seu gênero, idade, etnia e forte história familiar são fatores de risco que ele não pode modificar. Isso não torna a intervenção no estilo de vida fútil nesse caso, já que será benéfica para a saúde e bem-estar geral. No entanto, o senhor A poderá ainda desenvolver diabetes tipo 2 nos próximos dez anos. No entanto, estando menos obeso e participando em exercícios regulares, poderá retardar o início do diabetes comparativamente com o que aconteceria de outra forma. Do mesmo modo, se ele desenvolver diabetes, será mais simples de tratar.

A Figura 22.9 contém vinhetas relativas às principais recomendações. O *My Plate* contém recomendações do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, que substituíram a bem conhecida Pirâmide Alimentar. Os comentários críticos e a *Healthy Eating Plate*, nomeada alternativamente, foram recomendados pela Harvard School of Public Health. A *Eatwell Plate* é a recomendação desenvolvida pela National Health Service no Reino Unido.



A



B

FIG. 22.9 Alimentação saudável.
As recomendações atuais enfatizam a dieta equilibrada. (A) O *My Plate* contém as recomendações

atuais para uma alimentação saudável do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. Ele substituiu a Pirâmide Alimentar anteriormente utilizada. (B) O *eatwell plate*, desenvolvido pela Agência dos Padrões Alimentares do Reino Unido (www.food.gov.uk).

Quadro de conceitos avançados

Definições em ciência nutricional

As definições a seguir (dadas em negrito) são usadas pelo Food and Nutrition Board, Institute of Medicine (IOM) das National Academies dos Estados Unidos. As definições usadas no Reino Unido também são mencionadas. As necessidades são descritas pelas **Referências de Ingestão Dietética (DRI).** As DRI são descritas por:

- **Necessidade média estimada (EAR):** média diária de ingestão de nutrientes estimada para cumprir as necessidades de metade dos indivíduos saudáveis de grupo de um gênero particular, em uma determinada fase da vida. A EAR é complementada por:
 - **Ingestão dietética recomendada (RDA):** no Reino Unido, *Referência de Ingestão Nutricional (RNI)*. Descreve a média do nível de ingestão nutricional suficiente para corresponder às necessidades nutricionais de quase todos (97-98%) os indivíduos saudáveis. A *Referência Mínima de Ingestão Nutricional (LNRI)*, usada no Reino Unido: a ingestão diária observada no extremo mínimo da distribuição da ingestão em uma população (aproximadamente 2%). Se a ingestão cair abaixo desse nível, pode ocorrer uma deficiência.
- **Ingestão adequada (AI):** média da ingestão nutricional diária recomendada, baseada em estimativas de ingestão nutricional por um grupo de indivíduos saudáveis que é assumido como adequado — usado quando uma RDA não pode ser determinada.
- **Ingestão máxima tolerável (UL):** média da ingestão máxima diária mais provável a não trazer riscos à saúde para quase todos os indivíduos de um gênero particular, em uma determinada fase da vida. Se a ingestão aumentar além da UL, o risco de efeitos adversos aumenta.

Note que as DRI se destinam a pessoas saudáveis, e que uma DRI estabelecida para qualquer nutriente pressupõe que as necessidades dos outros estão sendo supridas.

A dieta é importante na prevenção de doença coronariana

Os nutrientes que afetam a aterosclerose são o colesterol dietético, as gorduras saturadas e os ácidos graxos *trans*. A ingestão calórica excessiva e a consequente obesidade também facilitam a aterosclerose. Elevadas quantidades de colesterol dietético e uma dieta rica em gorduras saturadas diminuem a expressão do receptor de LDL, de forma mediada por um aumento no conteúdo intracelular de colesterol nos hepatócitos: isso leva a um aumento de concentração plasmática do colesterol (Cap. 17). Os alimentos que contêm ácidos graxos saturados (leite integral, queijo, manteiga e carnes vermelhas) são aterogênicos, quando em excesso. A explicação por detrás das dietas pobres em colesterol é que a expressão do receptor de LDL pode ser aumentada se o conteúdo em colesterol

dietético for suficientemente baixo. A dieta ocidental típica contém aproximadamente 400-500 mg de colesterol por dia. A ingestão necessária para alcançar a redução do colesterol plasmático é muito menor — abaixo de 200 mg ou até mesmo inferior a 100 mg por dia.

Quadro de conceitos avançados

Tecido adiposo e doença

O tecido adiposo pode ser armazenado em três depósitos distintos no organismo: gordura **subcutânea** debaixo da pele; gordura **visceral** na cavidade abdominal; e gordura **ectópica,** como a bolsa adiposa cardíaca ou a deposição excessiva no próprio fígado e nos miócitos. A distribuição de gordura em uma pessoa depende de seu gênero e etnia, combinados com sua história familiar. Por exemplo, as mulheres são classicamente consideradas como tendo "forma de pera", com grandes depósitos adiposos subcutâneos em suas ancas e coxas, enquanto os homens têm "forma de maçã", com abdomes arredondados devido ao excesso de gordura visceral em sua cavidade abdominal. Pessoas com descendência sul-asiática, chinesa e japonesa, também são geralmente mais suscetíveis a depositarem gordura visceral excessiva, e não gordura subcutânea.

A gordura subcutânea é geralmente benigna; serve como reserva de energia. Os problemas de saúde relacionados com a deposição de gordura subcutânea são mecânicos, quando uma pessoa se torna tão grande que não consegue funcionar normalmente. A gordura visceral, contudo, é um órgão endócrino ativo que produz alguns mediadores, incluindo a interleucina 6, que levam à aterogênese aumentada e à doença cardiovascular prematura, e facilitam o desenvolvimento do diabetes tipo 2. Também promove um estado pró-coagulante (Cap. 7) por secreção do inibidor do ativador do plasminogênio 1 (PAI-1), que inibe a degradação da fibrina.

Um dos principais problemas associados à adiposidade visceral é a **esteatose hepática não alcoólica** (**NAFLD,** do inglês, *nonalcoholic fatty liver disease*). Isto é devido à acumulação de um excesso de ácidos graxos no fígado. Conduz a resistência hepática à insulina e é um fator de risco para o diabetes tipo 2, podendo também levar à hepatite e à cirrose hepática.

As bolsas adiposas ectópicas são menos bem compreendidas. As principais bolsas adiposas associadas a doença são a bolsa adiposa cardíaca e a bolsa adiposa faríngea. Pensa-se que a bolsa adiposa cardíaca tenha diversas características que possam ser mediadoras de doença cardíaca. A primeira é a simples obstrução mecânica do coração, que compromete a função cardíaca. Existe também a possibilidade de que essas células também liberem mediadores pró--coagulantes e inflamatórios que tenham um efeito local nas células. Existirá igualmente acumulação lipídica tóxica nos miócitos cardíacos. A bolsa adiposa faríngea está associada à apneia obstrutiva do sono; nesta condição, a faringe é obstruída durante o sono, levando a episódios de hipoxia e apneias (cessação temporária da respiração). As pessoas com essa condição têm muito

pouca qualidade de sono e estão em elevado risco de desenvolverem doença cardiovascular, incluindo hipertensão. Não se sabe se a bolsa adiposa faríngea tem efeitos além da obstrução da faringe.

A gordura visceral e ectópica é preferencialmente degradada durante a perda de peso. Isso significa que uma pessoa pode não ter que voltar a um peso "normal" de forma a diminuir substancialmente sua gordura visceral e ectópica, e os riscos de saúde que estas trazem.

Os nutrientes que aparentam ser protetores contra a aterosclerose incluem os ácidos graxos presente em peixes e em óleos de peixe poli-insaturados ricos em ω-6 (contido em óleos vegetais) e ω-3, na gordura monoinsaturada (contida, por exemplo, no azeite) e em fibras solúveis. Os poli-insaturados também reduzem a concentração plasmática de colesterol. Os ácidos graxos ω-3 reduzem os triglicerídios por redução da síntese de VLDL e aumento de seu catabolismo. Eles também são antitrombóticos: os óleos de peixe inibem a síntese de tromboxano e de PDGF, reduzem a viscosidade sanguínea e estimulam a fibrinólise. É interessante notar que eles parecem estabilizar eletricamente o músculo cardíaco, prevenindo arritmias e diminuindo a incidência de morte súbita na população que sofreu infarto do miocárdio. As gorduras monoinsaturadas aumentam a concentração de HDL, aumentam a sensibilidade à insulina e diminuem a concentração plasmática de triglicerídios.

As dietas pobres em gordura e colesterol conduzem normalmente a uma redução de aproximadamente 10% no colesterol sérico, se aplicadas durante testes clínicos, e a uma diminuição menor (geralmente inferior a 5%) quando aplicadas à população em geral. O álcool parece ser protetor contra a doença coronariana, mas quando ingerido em excesso traz muitos outros riscos, incluindo a obesidade. Infelizmente, as dietas pobres em lipídios parecem reduzir o colesterol HDL em 10-20%.

Igualmente, as dietas pobres em gordura, quando o conteúdo proteico é mantido constante, tendem a ser ricas em carboidratos. Apesar das recomendações para o uso predominante de carboidratos complexos, em muitas populações a ingestão de açúcares refinados constitui uma proporção excessivamente elevada da ingestão de carboidratos e isso promove a obesidade. As dietas ricas em carboidratos também podem levar à hipertrigliceridemia.

A dieta pobre em carboidratos e a dieta mediterrânea são alternativas à dieta pobre em gordura no que diz respeito à prevenção cardiovascular e à perda de peso

Durante muitos anos, a dieta **pobre em colesterol e pobre em gordura** era a marca registrada da prevenção cardiovascular. Contudo, a emergência da epidemia da obesidade e a maior compreensão do papel dos carboidratos no desenvolvimento da resistência à insulina e da síndrome metabólica focaram as atenções nas dietas **pobres em carboidratos** e contendo geralmente alimentos de baixo índice glicêmico (ver anteriormente).

Dois tipos de dieta parecem ter significativos benefícios na saúde. As **dietas pobres em carboidratos** (a dieta de Atkins e seus derivados) destacam o baixo conteúdo em

carboidratos, em conjunto com a ingestão calórica irrestrita, e são usadas primariamente como meio de redução e manutenção de peso. Tipicamente, tal dieta contém 20 g de carboidratos por dia durante a fase de indução de dois meses. Subsequentemente, o conteúdo em carboidratos aumenta gradualmente até os 120 g. A maioria dos regimes também incentiva o consumo de gordura e proteína a partir de fontes vegetarianas e a evitar gorduras *trans*. As pessoas que seguem a dieta pobre em carboidratos são particularmente suscetíveis à cetonúria.

A **dieta mediterrânea** contém quantidades moderadas de gordura e uma elevada proporção de gorduras monoinsaturadas. É rica em vegetais, pobre em carne vermelha e, em vez disso, contém aves e peixe, assim como grãos pobres em gordura, frutas e legumes. Para atingir a perda de peso, a restrição calórica é necessária. Estudos baseados em pesquisas sugerem que tanto as dietas pobres em carboidratos quanto a dieta mediterrânea levam a uma maior perda de peso do que a dieta pobre em gorduras. Em termos de efeito no risco cardiovascular, essas dietas são pelo menos alternativas à dieta pobre em gorduras convencional.

O estilo de vida e a dieta podem influenciar a incidência de câncer

A elevada ingestão de frutas e vegetais parece proteger contra o câncer, possivelmente devido à presença de antioxidantes e fibras. Os laticínios também parecem ser protetores. Houve sugestões de que dietas ricas em gorduras poderiam aumentar o risco de câncer, mas a evidência epidemiológica para tal é fraca. Em estudos clínicos, o β-caroteno, os retinoides (Cap. 11), as fibras e o cálcio não se revelaram efetivos na prevenção do câncer. A perda massiva de peso com a **cirurgia bariátrica** demonstrou uma redução na incidência de câncer.

A baixa ingestão de cálcio pode estar relacionada com o risco de osteoporose

A osteoporose está associada a baixa massa óssea e a fragilidade óssea, o que resulta em um risco aumentado de fraturas (Cap. 26). É particularmente relevante nos idosos. O cálcio é necessário à mineralização óssea, e é reconhecido que a ingestão suficiente de **cálcio,** conjuntamente com a de **vitamina D**, nos adultos mais velhos, está associada a um menor risco de osteoporose. A elevada ingestão de álcool e a baixa massa corporal estão associadas a um risco aumentado de osteoporose. Numerosos outros fatores nutricionais foram relacionados com a saúde óssea, embora com menos evidência, incluindo o zinco, o cobre, o manganês, o boro, a vitamina A, a vitamina C e a vitamina K; uma dieta contendo quantidades elevadas de frutas e vegetais é recomendada para uma saúde óssea ótima.

Resumo

- Uma nutrição apropriada constitui a base da saúde e do bem-estar, e uma má nutrição aumenta a suscetibilidade à doença.
- A ingestão alimentar é controlada por um sistema neuroendócrino que responde a sinais gerados no tecido adiposo.

- O genótipo, a disponibilidade de alimentos, o estado de saúde e a atividade física são fatores que determinam o estado nutricional.
- As necessidades nutricionais mudam ao longo do ciclo de vida.
- As principais categorias de nutrientes são os carboidratos, as gorduras, as proteínas, as vitaminas e os minerais. O balanço hídrico está intimamente associado à nutrição.
- A avaliação do estado nutricional é uma parte importante da avaliação clínica geral. Ela inclui a avaliação da dieta atual, do histórico dietético, exame clínico e uma gama de testes bioquímicos e hematológicos.
- A desnutrição afeta extensas áreas dos países em desenvolvimento e, nos países desenvolvidos, é um problema entre grupos sociais de baixo rendimento e também pessoas hospitalizadas.
- A obesidade se tornou um importante problema de saúde em todo o mundo.
- O suporte nutricional inclui a assistência gradual à ingestão de nutrientes, incluindo desde o auxílio nas refeições até a nutrição parenteral total.

Questões para aprendizagem

1. Esquematize os processos que mantêm a homeostasia energética.
2. Descreva o papel das diferentes classes de ácidos graxos na nutrição.
3. Enumere os princípios de um programa de redução de peso.
4. Discuta situações em que a demanda nutricional aumentada pode desencadear a desnutrição.
5. Que dieta recomendaria a um paciente diabético?

Leituras sugeridas

Brand-Miller, J., Buyken, A. E. The glycemic index issue. *Curr Opin Lipidol*. 2012; 23:62–67.

Collins, S., Yates, R. The need to update the classification of acute malnutrition. *Lancet*. 2003; 362:249.

Cota, D. CXB1 receptors: emerging evidence for central and peripheral mechanisms that regulate energy balance, metabolism, and cardiovascular health. *Diabetes/Metabol Res Rev*. 2007; 23:507–517.

Crowley, V. E.F. Overview of human obesity and central mechanisms regulating energy homeostasis. *Ann Clin Biochem*. 2008; 45:245–255.

Dietary Reference Values for Food Energy and Nutrients for the United Kingdom. Report of the Panel on Dietary Reference Values of the Committee on Medical Aspects of Food Policy, Department of Health, London, 2003, TSO.

Eckel, R. H. Nonsurgical management of obesity. *N Engl J Med*. 2008; 358:1941–1950.

Elamin, E. Dietary and pharmacological management of severe catabolic conditions. *Am J Med Sci*. 2011; 342:513–518.

Gastadelli, A. Role of beta-cell dysfunction, ectopic fat accumulation and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Diab Res Clin Pract*. 2011; 93S:560–565.

Gidden, F., Shenkin, A. Laboratory support of the clinical nutrition service. *Clin Chem Lab Med*. 2000; 38:693–714.

Ramachandrappa, S., Farooqi, I. S. Genetic approaches to understanding obesity. *J Clin Invest*. 2011; 121:2080–2086.

Shai, I., Schwarzfuchs, D., Henkin, Y., et al. Weight loss with a low-carbohydrate, Mediterranean, or low-fat diet. *N Engl J Med*. 2008; 359:229–241.

Vincent, H. K., Innes, K. E., Vincent, K. R. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. *Diabetes Obesity Metabol*. 2007; 9:813–839.

Willett, W. C., Ludwig, D. S. The 2010 dietary guidelines – the best recipe for health? *N Engl J Med*. 2011; 365(17):1563–1565.

Sites e downloads

BAPEN: What is malnutrition, www.bapen.org.uk/about-malnutrition/ introduction-to-malnutrition.

BAPEN Malnutrition Universal Screening Tool, www.bapen.org.uk/pdfs/must/must_full.pdf.

Burani J. Gushers and Tricklers. Practical use of the glycemic index, 2006. www.glycemicindex.com/cmsAdmin/uploads/glycemicindex.ppt.

ChooseMyPlate.gov. United States Department of Agriculture.

www.choosemyplate.gov/.

www.cnpp.usda.gov/Publications/MyPlate/GettingStartedWithMyPlate.pdf.

Dietary Reference Intakes: Applications in Dietary Planning (2003). Food and Nutrition Board, Institute of Medicine (IOM) of the National Academies, www.iom.edu.

Eight tips for healthy eating – Live Well – NHS Choices, www.nhs.uk/Livewell/Goodfood/Pages/eight-tips-healthy-eating.aspx.

Eatwell plate, www.nhs.uk/Livewell/Goodfood/Documents/Eatwellplate.pdf.

International chair on cardiometabolic risk, www.myhealthywaist.org.

UK Food Standards Agency, www.Foodstandards.gov.uk.

World Health Organization: Obesity, www.who.int/topics/obesity/en/.

World Health Organization: Management of Severe Malnutrition: A Manual for Physicians and Other Senior Health Workers, Geneva, 1999, WHO. www.who.int/nutrition/publications/severemalnutrition/9241545119/en/.

The glycemic index, www.glycemicindex.com.

The Nutrition Source. Healthy Eating Plate vs. USDA's MyPlate, www.hsph.harvard.edu/nutritionsource/healthy-eating-plate/healthy-eating-plate-vs-usda-myplate/index.html.

CAPÍTULO 23

O Papel dos Rins no Metabolismo

Marek H. Dominiczak and Mirosława Szczepańska-Konkel

Objetivos

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever os mecanismos do nefrônio para lidar com o sódio e a água.
- Discutir as relações entre o consumo de oxigênio pelo rim e a reabsorção de sódio.
- Explicar o papel da ATPase sódio/potássio no nefrônio.
- Explicar de que forma a análise de urina pode fornecer informação clinicamente importante.
- Descrever a avaliação clínica da taxa de filtração glomerular.
- Reconhecer os possíveis mecanismos de proteinúria.

Introdução

Os rins humanos pesam cerca de 300 g. Têm um fornecimento sanguíneo importante, recebendo cerca de 25% do débito cardíaco. Cerca de 80% do sangue é distribuído no córtex renal e 20% na medula renal. Praticamente todo o sangue passa através dos capilares glomerulares, que atuam como filtros de alta pressão. Diariamente cerca de 180 litros de plasma contendo vários quilogramas de proteínas plasmáticas, cloreto de sódio e outros eletrólitos, e metabólitos, são filtrados através de uma área de filtração glomerular de 0,5-2 m^2. Mais de 99,9% das proteínas plasmáticas são retidas pelo filtro, enquanto a quase totalidade da água, cloreto de sódio e outros solutos filtrados são retidos por sistemas de transporte nos túbulos renais. Em condições normais, os rins formam 1-2 litros de urina por dia. A composição da urina está resumida na Tabela 23.1.

Tabela 23.1

Excreção diária de compostos nitrogenados e principais íons na urina (mmol/24 h)

Ureia	Ácido úrico	Creatinina	Amônia
250-500	1-5	7-15	30-50

Sódio	Potássio	Cloreto	Fosfato
100-250	30-100	150-250	15-40

A **ureia** é um dos principais contribuintes para a excreção urinária de nitrogênio. É o produto final do catabolismo proteico em humanos. A excreção diária de ureia também reflete o estado nutricional e está bastante dependente da ingesta proteica.

A excreção de **ácido úrico** depende principalmente da degradação de purinas endógenas, mas também pode estar elevada em uma dieta rica em purinas.

A **creatinina** deriva da fosfocreatina do músculo esquelético.

Em estado de equilíbrio metabólico, a excreção urinária de compostos de **nitrogênio** depende estritamente da função renal.

Na **insuficiência renal** o débito urinário diminui, o que leva a um aumento das concentrações plasmáticas de ureia e creatinina.

A excreção urinária de sódio, potássio e cloreto reflete a sua ingesta.

A ingestão excessiva de sódio ou o comprometimento de sua eliminação pode levar a hipertensão.

A amônia é formada no rim por desaminação da glutamina e do glutamato, e é excretada sob a forma de íon amônio. A excreção diária de amônia e fosfato depende da excreção do íon hidrogênio na urina (Cap. 25).

São dados valores aproximados para um adulto de estatura média.

As funções-chave do rim são a filtração do plasma e subsequente excreção tubular e reabsorção de íons, substâncias de baixo peso molecular e água

A função excretora dos rins envolve a filtração do plasma no glomérulo, o transporte de água e solutos do lúmen tubular novamente para o sangue (reabsorção tubular) e a secreção de diferentes substâncias das células tubulares para o lúmen.

Os rins removem, na urina, produtos do metabolismo tais como a ureia, o ácido úrico e a creatinina, e retêm substâncias como a glicose, os aminoácidos e as proteínas. Também metabolizam e removem fármacos e toxinas. Desempenham um papel fundamental na regulação do volume e composição do fluido extracelular e na manutenção do equilíbrio acidobásico (Caps. 24 e 25). Estas funções são reguladas ao nível hormonal pela vasopressina (hormônio antidiurético, ADH), produzida na hipófise posterior e pelo sistema renina-angiotensina. A função renal é também controlada pela norepinefrina e dopamina liberadas das terminações nervosas no próprio rim.

Os rins produzem ainda calcitriol (1,25-di-hidroxicolecalciferol, $1,25(OH)_2D_3$), uma vitamina envolvida na homeostasia do cálcio (Cap. 26), e eritropoietina, que controla a produção de eritrócitos.

A unidade funcional do rim é o nefrônio

Cada rim consiste em aproximadamente 1 milhão de nefrônios compostos por glomérulos e um túbulo excretor (Fig. 23.1). Os glomérulos, localizados no córtex renal, são filtros biológicos que fazem a interface entre o plasma e os túbulos, e que reabsorvem e excretam substâncias. Os segmentos de cada túbulo (com início na extremidade glomerular) são denominados **túbulo proximal, alça de Henle, túbulo distal** e **ducto coletor.**

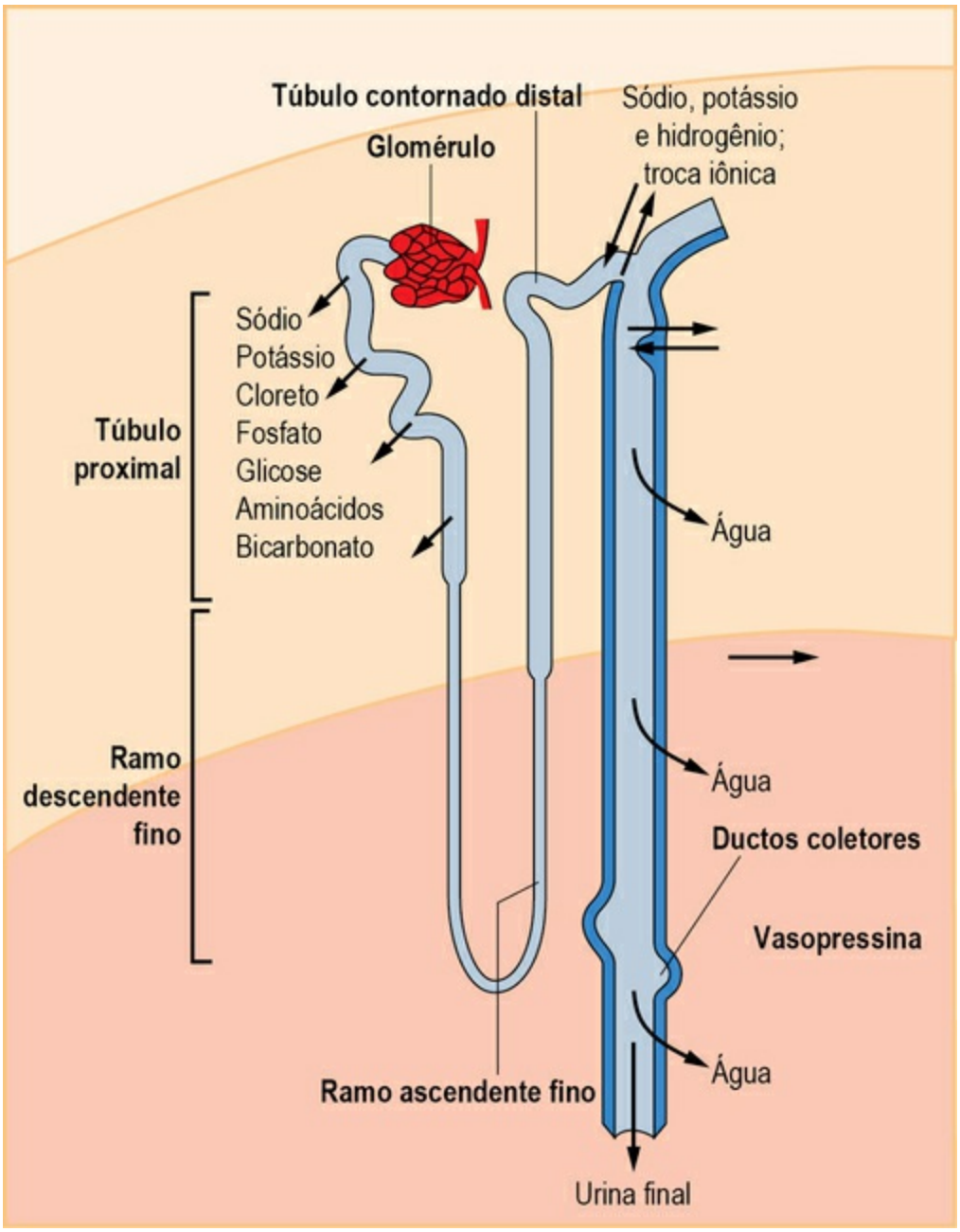


FIG. 23.1 O nefrônio e seus principais locais de transporte.

A barreira de filtração glomerular

O plasma dos capilares glomerulares é filtrado para o interior do glomérulo, conhecido como espaço de Bowman. A barreira de filtração inclui uma camada de células endoteliais que revestem os vasos sanguíneos glomerulares, a membrana basal e as células epiteliais (podócitos) com pedicelos característicos (Fig. 23.2). A filtração

glomerular depende da superfície de filtração e da permeabilidade da barreira.

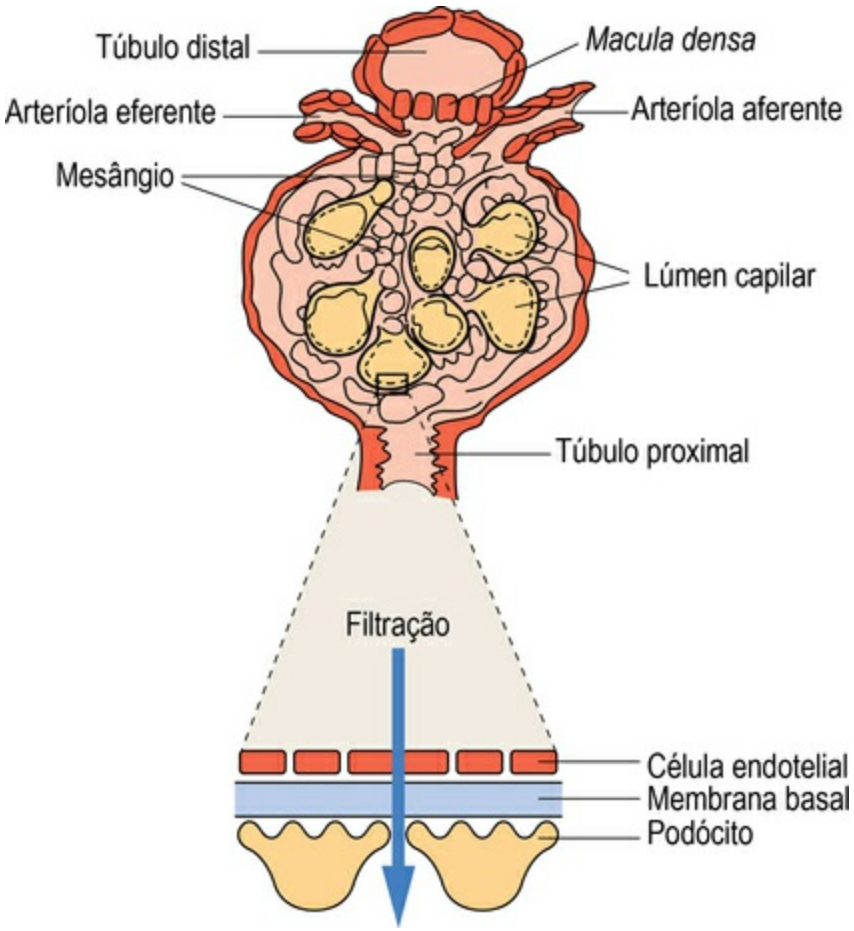


FIG. 23.2 Barreira de filtração glomerular. A barreira consiste em células endoteliais, membrana basal e podócitos. As células da *macula densa* fazem parte do aparelho justaglomerular: estas são sensíveis à concentração de cloreto no túbulo distal e ajustam o diâmetro das arteríolas aferentes, regulando o fluxo sanguíneo glomerular.

O principal componente da membrana basal glomerular é o colágeno tipo IV, que forma uma rede de filamentos fornecendo elasticidade e resistência à pressão hidrostática. A membrana contém também laminina, fibronectina e proteoglicanos com grupos sulfato de heparan de carga negativa que formam uma barreira eletrostática para as proteínas filtradas do plasma.

Os podócitos e as células mesangiais possuem receptores para uma variedade de substâncias vasoativas, como a angiotensina II, a vasopressina, a bradiquinina, o ATP, a endotelina, as prostaglandinas, a dopamina, os peptídios natriuréticos e os nucleotídios de adenina.

As fenestrações na camada endotelial e os espaços entre os pedicelos dos podócitos formam um crivo que filtra água e pequenas moléculas. A filtração de moléculas maiores é limitada pelo seu tamanho, forma e carga elétrica. Por exemplo, em pH 7,4, a maioria das proteínas plasmáticas tem carga negativa, assim como a barreira de filtração; isso dificulta a filtração até das menores proteínas, como a mioglobina (massa molecular de 17 kDa), e praticamente previne a filtração da albumina, que é comparativamente maior (69 kDa).

A filtração glomerular é conduzida pela pressão hidrostática nos capilares

glomerulares, que é de aproximadamente 50 mmHg. A pressão hidrostática é contrariada pela pressão oncótica do plasma e pela contrapressão (aproximadamente 10 mmHg) do filtrado na cápsula glomerular. Variações na taxa de filtração glomerular alteram a quantidade total de água e solutos filtrados, mas não a composição do filtrado. Uma diminuição da pressão sanguínea na arteríola aferente do glomérulo é sentida por um grupo de células conhecido como aparelho justaglomerular. Esse aparelho estimula a secreção de renina e ativa o sistema renina-angiotensina. Um aumento da pressão sanguínea intracapilar e/ou hiperfiltração podem causar lesão nas células glomerulares e levar a lesão renal grave.

Filtrado glomerular: formação da urina

Os rins consomem grandes quantidades de oxigênio, principalmente para suportar o transporte ativo de sódio

Os processos metabólicos nos rins são, em sua maioria, aeróbicos e, consequentemente, seu consumo de oxigênio é elevado: aproximadamente igual ao consumo do músculo cardíaco e três vezes superior ao do cérebro. Essa elevada atividade metabólica é necessária para manter a reabsorção tubular: cerca de 70% do oxigênio consumido pelo rim é utilizado para suportar o transporte ativo de sódio, que, por sua vez, determina a reabsorção de glicose e de aminoácidos.



Quadro de conceitos avançados

Hiperglicemia e estresse mecânico resultantes de hipertensão glomerular contribuem para o desenvolvimento de nefropatia diabética

O estresse mecânico e a concentração elevada de glicose desencadeiam múltiplas vias de sinalização que podem acelerar a lesão das células glomerulares. Os podócitos, células que revestem a face exterior da membrana basal glomerular, são sujeitos não só à carga da glicose filtrada, mas também a diversas forças mecânicas. Tanto a glicose elevada quanto o estresse mecânico podem comprometer os sistemas de proteínas envolvidos na ancoragem dos pedicelos dos podócitos na membrana basal glomerular (integrina, agrina) e, dessa forma, diminuir a resistência destas células às forças mecânicas, causando sua dissociação da membrana (e seu aparecimento na urina). A modulação, por estes fatores de expressão e atividade, de variadas proteínas estruturais e funcionais, tais como a actina, a nefrina, a podocina, e de outros compostos, como a fosfolipase C, os fatores de crescimento, as citocinas e as quimiocinas, resulta em resposta inflamatória, disfunção e apoptose ou necrose dos podócitos. A perda de podócitos é irreversível devido à sua incapacidade de proliferar e substituir as células danificadas. Os podócitos sofrem lesão precocemente no decorrer da nefropatia diabética.

Reabsorção de sódio. Cerca de 80% do sódio filtrado é reabsorvido no túbulo proximal. O sódio é reabsorvido por vários mecanismos: através de canais iônicos específicos, por troca com o íon hidrogênio, e por cotransporte com glicose, aminoácidos, fosfato e outros ânions. O movimento do sódio causa a reabsorção de água (Fig. 23.3). A entrada de sódio para as células do túbulo proximal é passiva. Isso é possibilitado pela ATPase-Na^+/K^+, que mantém a concentração de sódio baixa no citoplasma das células tubulares. No túbulo distal e no ducto coletor é ainda reabsorvido mais sódio por troca com o íon potássio ou hidrogênio. Esse processo é controlado pela aldosterona (Figs. 23.3 e 23.4).

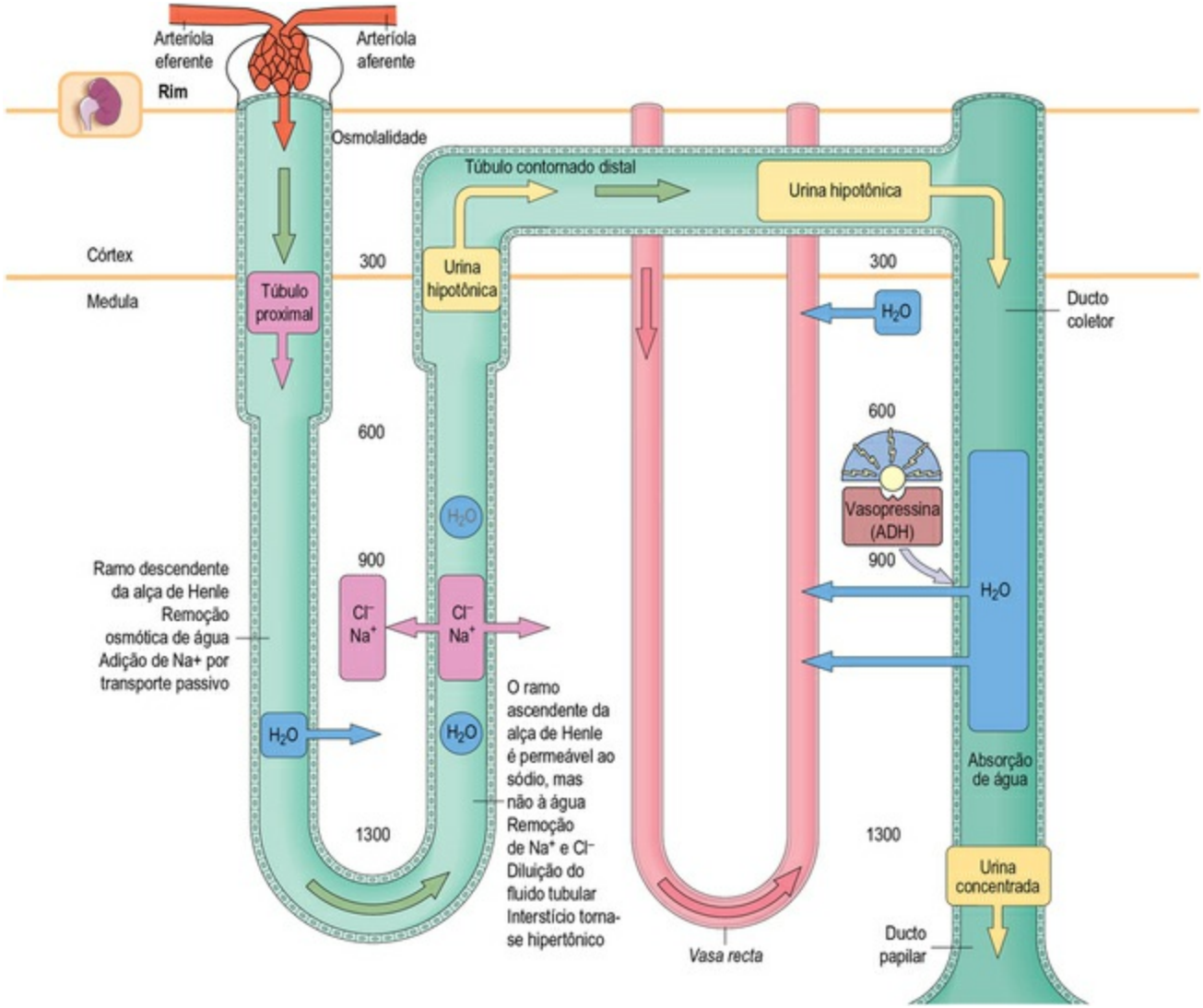


FIG. 23.3 Troca em contracorrente e multiplicação nos túbulos renais. O mecanismo de contracorrente é essencial para a formação de urina, e para a reabsorção de água no túbulo distal. No **ramo ascendente da alça de Henle,** os íons sódio e cloreto são bombeados para o fluido intersticial. Posteriormente, podem-se difundir livremente para o lúmen do **ramo descendente,** criando uma alça funcional que perpetua o aumento da osmolalidade do filtrado que alcança o ramo ascendente. Esse mecanismo é conhecido como **multiplicação por contracorrente.** Assim, enquanto a osmolalidade do córtex renal é semelhante à do plasma (300 mmol/L), a da medula pode chegar a 1.300 mmol/L. Essa elevada osmolalidade da medula facilita depois a reabsorção de água nos ductos coletores. Esse mecanismo é conhecido como **troca em contracorrente.** A quantidade de água reabsorvida é controlada pela vasopressina.

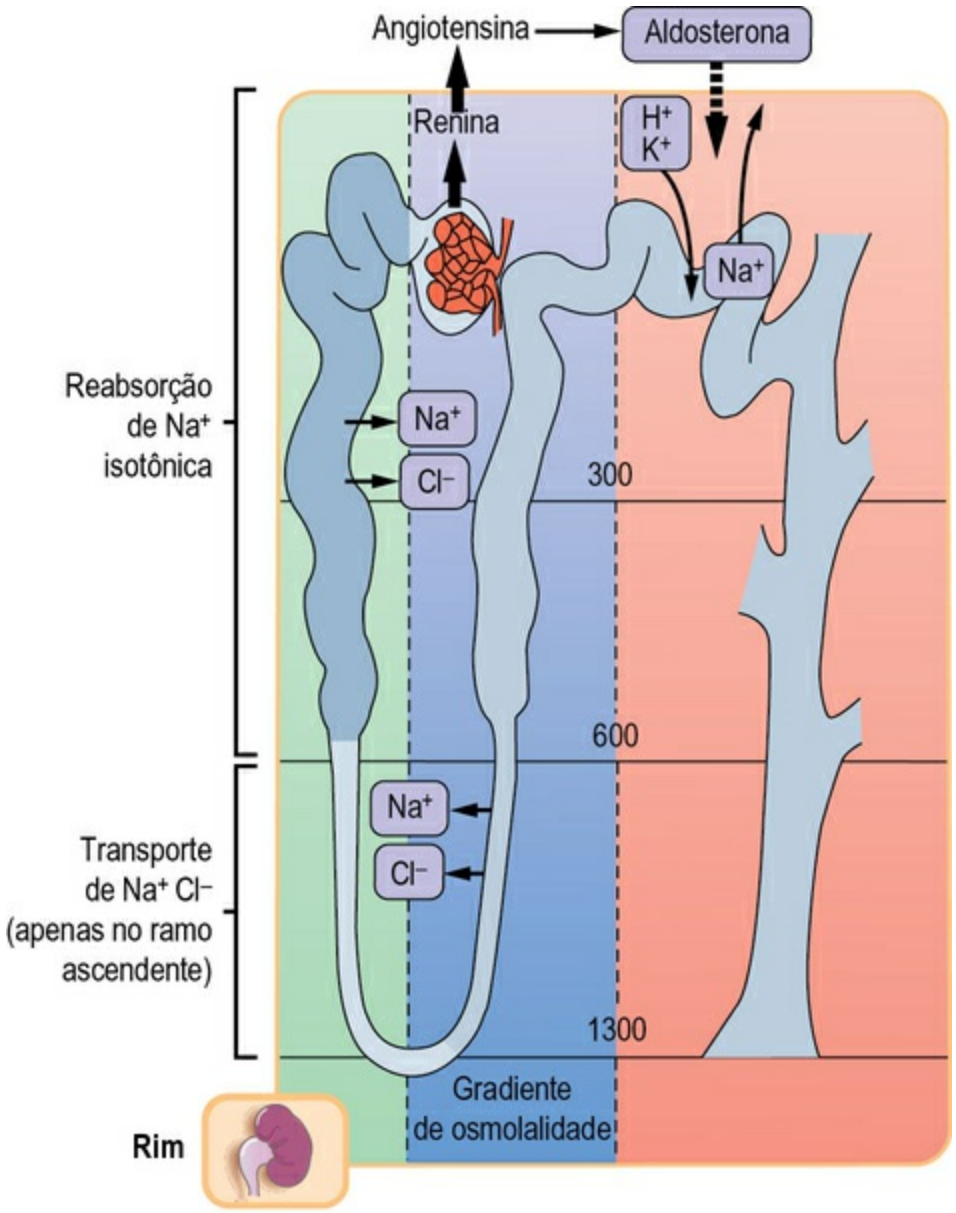


FIG. 23.4 Reabsorção de sódio nos túbulos renais. Mais de 80% do sódio filtrado é ativamente reabsorvido no túbulo proximal. Os íons sódio e cloreto são também reabsorvidos no ramo ascendente da alça de Henle. Ao nível do túbulo distal ocorre um mecanismo diferente, em que a reabsorção do sódio é estimulada pela **aldosterona** e está acoplada à secreção de íons hidrogênio e potássio. A aldosterona promove a retenção de sódio e o aumento da excreção de potássio.

Reabsorção de água. O fluido que deixa o túbulo proximal é isotônico. As diferentes permeabilidades dos ramos ascendente e descendente da alça de Henle mantêm uma alta osmolalidade da medula. Essa osmolalidade é essencial para a subsequente reabsorção de água no ducto coletor (Fig. 23.5). O fluido que deixa a alça de Henle é diluído (hipotônico). A reabsorção de água no ducto coletor é controlada pela vasopressina (Fig. 23.3).

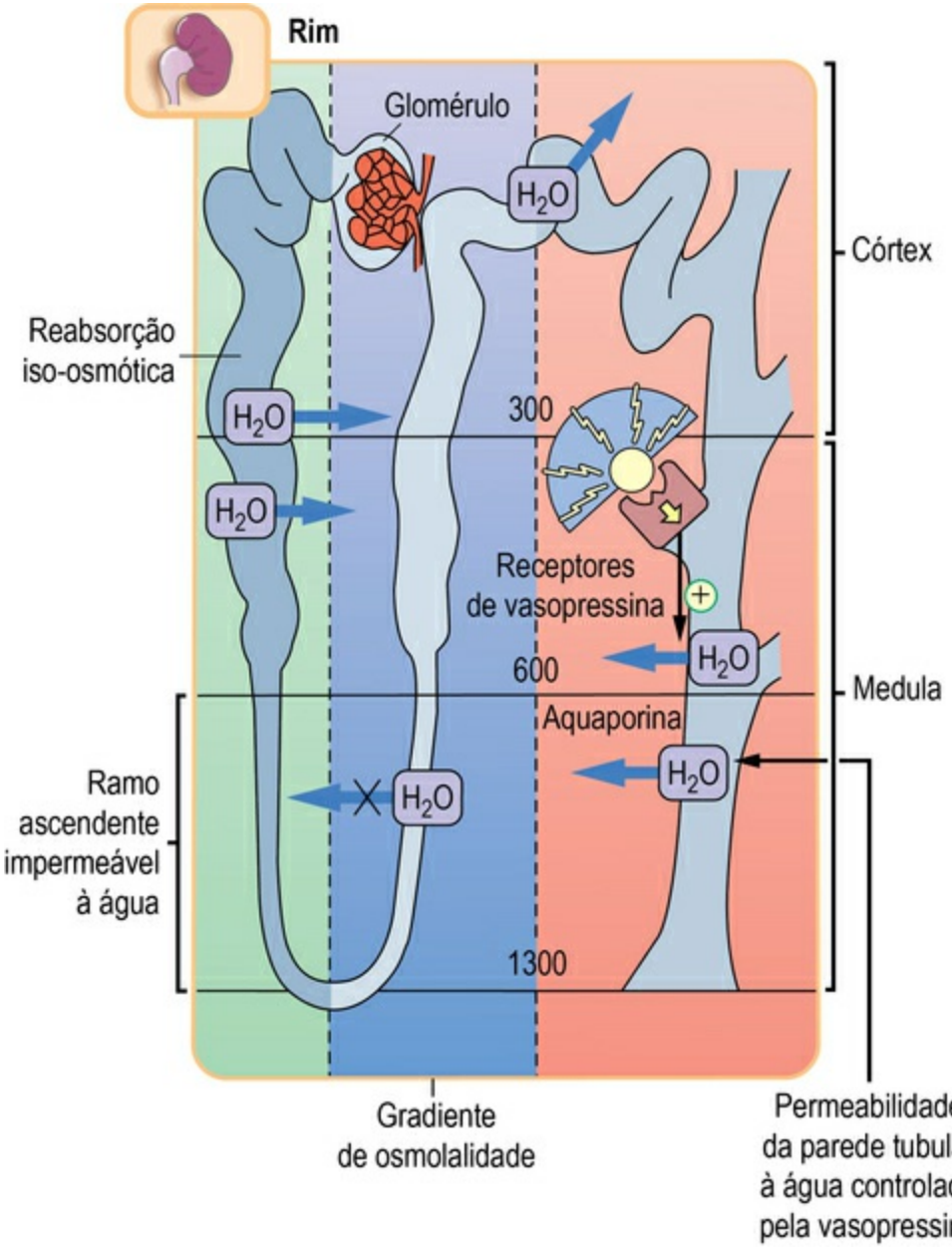


FIG. 23.5 Mecanismos renais para o transporte de água. A permeabilidade das paredes tubulares para a água difere ao longo do nefrônio. Cerca de 80% da água filtrada é reabsorvida no túbulo proximal por reabsorção iso-osmótica. O ramo ascendente da alça de Henle é impermeável à água. No ducto coletor, a **vasopressina** controla a reabsorção de água através de **canais de água,** as **aquaporinas** (Cap. 24).

Papel dos rins na homeostasia da glicose

Os rins contribuem para a homeostasia da glicose através de três mecanismos diferentes: a liberação de glicose para a circulação através da **gliconeogênese,** a **captação de glicose** da circulação para satisfazer as próprias necessidades energéticas e a **reabsorção de glicose** do filtrado glomerular.

A gliconeogênese renal

Em humanos, apenas o fígado e o rim têm capacidade para realizar a gliconeogênese (Cap. 13). Após uma noite de jejum, 75-80% da glicose liberada na circulação provêm do fígado, e os restantes 20-25% derivam do rim. Surpreendentemente, após uma refeição, a

gliconeogênese renal aumenta cerca de duas vezes e é responsável por aproximadamente 60% da glicose endógena liberada no período pós-prandial (a gliconeogênese hepática diminui cerca de 80% nesta fase). A **glutamina** e o **lactato** são os precursores gliconeogênicos preferenciais do rim.

As enzimas-chave da gliconeogênese, a piruvato carboxilase, o fosfoenol piruvato carboxicinase, a frutose-1,6-bifosfatase e a glicose-6-fosfatase, são encontradas maioritariamente nas células corticais renais. A taxa de gliconeogênese depende da concentração de glicose, da disponibilidade de substrato e do controle hormonal. A insulina inibe a liberação de glicose pelo rim enquanto a epinefrina estimula sua liberação. O glucagon não tem nenhum efeito na liberação renal de glicose. A glicose produzida fornece ao cérebro e a outros órgãos um substrato energético necessário, particularmente quando a gliconeogênese hepática está comprometida: por exemplo, após transplantação hepática, na insuficiência hepática e durante jejum prolongado, hipoglicemia e acidose.

A utilização renal de glicose

O destino metabólico da glicose varia conforme as diferentes regiões do rim. A glicose é um substrato energético essencial para a medula renal devido à baixa tensão de oxigênio e aos níveis baixos de enzimas oxidativas nesta zona. Consequentemente, o lactato é o principal produto final do metabolismo da glicose na medula.

Em contraste, o córtex renal contém níveis elevados de enzimas oxidativas. Os principais substratos energéticos no córtex renal são, por isso, os ácidos graxos, o lactato, o glutamato, o citrato e os corpos cetônicos. Destes, os ácidos graxos são a principal fonte energética.

As células tubulares renais com uma elevada atividade da ATPase Na^+/K^+ possuem múltiplas mitocôndrias situadas próximo à membrana plasmática, para que o ATP liberado esteja facilmente acessível.

Controle neuronal da função renal

Os rins comunicam com o sistema nervoso central através de nervos sensitivos (aferentes). Um aumento na atividade aferente renal influencia diretamente a descarga simpática para os rins através de nervos eferentes. A norepinefrina liberada das terminações nervosas, juntamente com cotransmissores (como o ATP, outros mono e dinucleotídios de adenina e o neuropeptídio Y), modifica a função renal (Fig. 23.6). A norepinefrina estimula diretamente a reabsorção de sódio por ativação da ATPase Na^+/K^+ tubular, e indiretamente por ativação do sistema renina-angiotensina (Fig. 23.7). O aumento da atividade simpática renal foi identificado como um fator importante para a complexa fisiopatologia da **hipertensão.** Por outro lado, a desenervação renal leva à diminuição da pressão sanguínea.

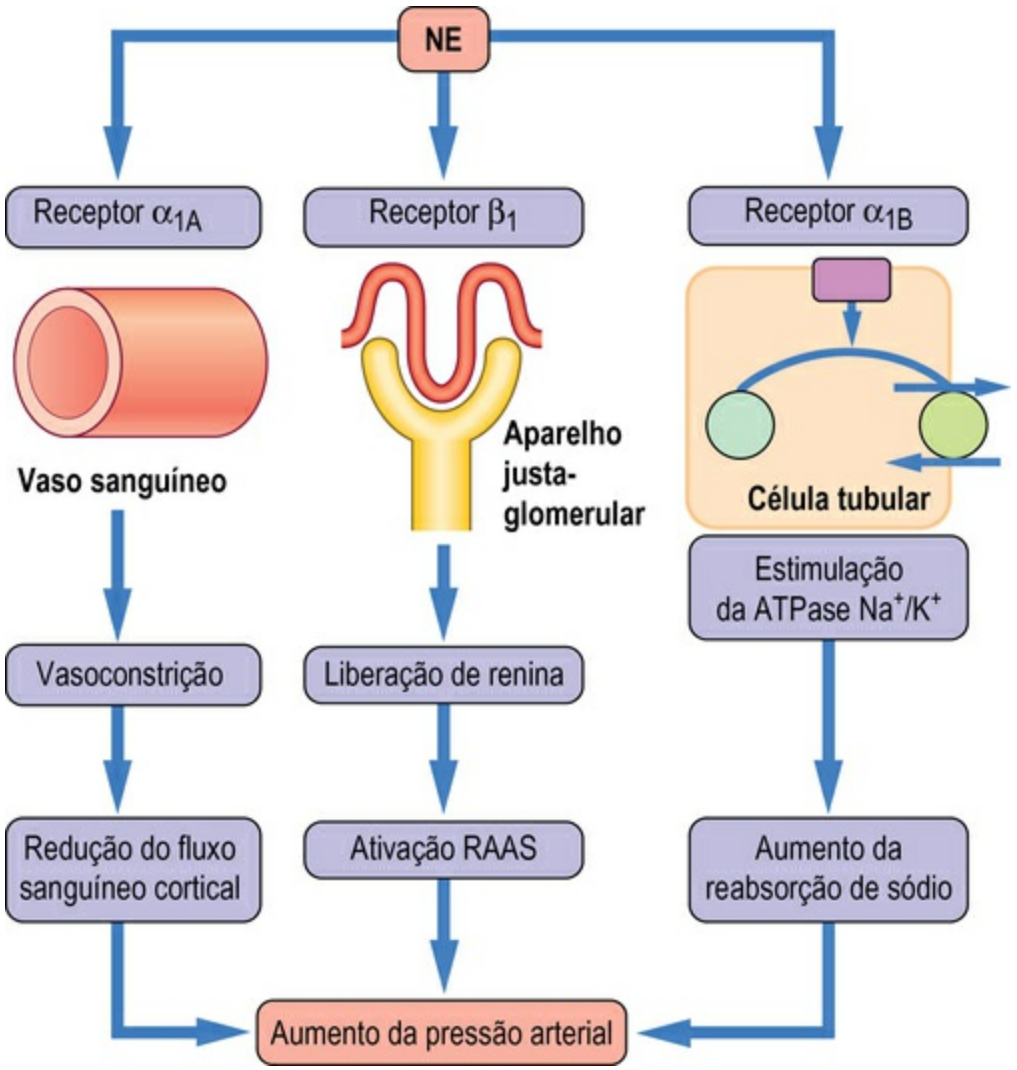


FIG. 23.6 Efeitos renais da norepinefrina. Os rins têm uma densa inervação simpática, cujos terminais se encontram nos vasos sanguíneos, no aparelho justaglomerular e nos túbulos renais. A estimulação dos nervos simpáticos renais causa liberação de norepinefrina, que vai levar ao aumento da taxa de secreção de renina por ativação dos receptores β_1-adrenérgicos, ao aumento da reabsorção renal de sódio por ativação dos receptores α_{1B} e da ATPase Na^+/K^+ tubular e à diminuição do fluxo sanguíneo renal por ativação dos receptores α_{1A}-adrenérgicos. Em geral, a ativação dos receptores adrenérgicos renais leva a um aumento da pressão arterial. NE, norepinefrina; RAAS, sistema renina-angiotensina-aldosterona.

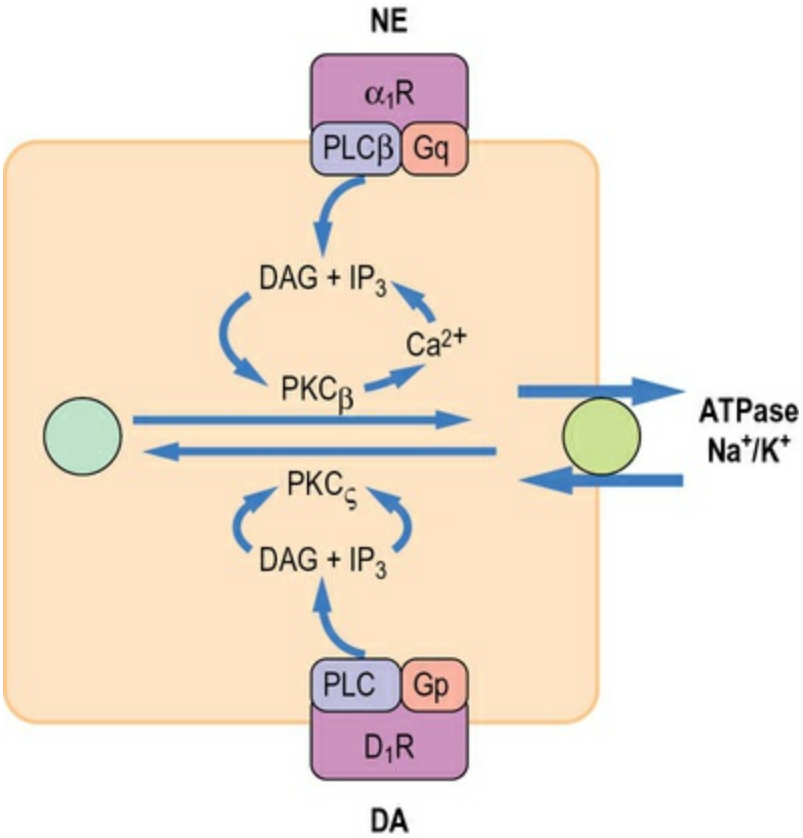


FIG. 23.7 A norepinefrina e a dopamina regulam a reabsorção de sódio no túbulo proximal do rim. A norepinefrina e a dopamina regulam a ATPase Na^+/K^+. A norepinefrina estimula a ATPase Na^+/K^+ através dos receptores α_{1B}-adrenérgicos, que por intermédio de proteínas G estimulam a fosfolipase C_β e a proteína cinase C_β, resultando na fosforilação da enzima e consequente translocação para a membrana celular. Por outro lado, a dopamina inibe a ATPase Na^+/K^+. A dopamina se liga a seu receptor e por intermédio de proteínas G estimula a fosfolipase C, que por sua vez ativa a proteína cinase C_ζ. A PKC_ζ forforila a ATPase Na^+/K^+ da membrana induzindo sua translocação para o citoplasma. NE, norepinefrina; DA, dopamina; PKC_β, proteína cinase C_β; PKC_ζ, proteína cinase C_ζ; α_1R, receptores α_{1B}-adrenérgicos; D_1R, receptor de dopamina 1.

Sistemas de transporte membranares no rim

ATPase Na^+/K^+

A atividade da ATPase Na^+/K^+ no rim é várias milhares de vezes superior àquela em outros tecidos. No rim, sua função primordial é a reabsorção de sódio através da catalisação da extrusão de sódio para o fluido intersticial. Existe uma relação próxima entre a quantidade de ATPase Na^+/K^+ e a capacidade de reabsorção de sódio nos diferentes segmentos do nefrônio. Nas células tubulares renais, tal como em todas as células epiteliais que reabsorvem sódio, a ATPase Na^+/K^+ está presente na membrana basolateral. No nefrônio, sua atividade é controlada por um conjunto de hormônios, principalmente pela aldosterona, angiotensina II e pelos neurotransmissores norepinefrina e dopamina (Cap. 24). Nos humanos, os rins reabsorvem cerca de 18 moles de sódio por dia e utilizam cerca de 6 moles de ATP para este processo. Assim, a **ATPase Na^+/K^+ é um transdutor de energia** que converte energia metabólica em gradientes iônicos.

O sistema de transporte de sódio nos túbulos renais

A reabsorção de sódio ocorre ao longo do nefrônio, com exceção da porção descendente da alça de Henle. A força motriz para a reabsorção de sódio e de outros solutos é o gradiente eletroquímico gerado pela ATPase Na^+/K^+ na membrana basolateral das células tubulares. O transporte de íons sódio através da membrana celular, à semelhança de outras moléculas polares, requer o envolvimento de proteínas membranares específicas.

A compreensão dos sistemas de transporte renais elucida acerca da ação dos diuréticos

No túbulo proximal os íons sódio entram para a célula no lado luminal através do permutador sódio-hidrogênio (NHE3), de canais iônicos e de cotransportadores com glicose, fosfatos e aminoácidos. O cotransportador sódio-bicarbonato (conhecido como NBC1) está localizado na membrana basolateral.

Na porção fina do ramo ascendente da alça de Henle, os íons sódio entram para a célula através do cotransportador sódio-potássio-cloreto (conhecido como NKCC2), que é inibido pela **furosemida.** Neste segmento, os íons potássio são secretados para o lúmen pelo canal retificador de potássio sensível ao ATP.

No túbulo distal a reabsorção de íons sódio envolve o cotransportador sódio-cloreto (NCC), que é sensível às **tiazidas.**

No ducto coletor os íons sódio são reabsorvidos pelo canal de sódio epitelial (ENaC) sensível ao **amiloride.** A aldosterona, através do receptor de mineralocorticoides, estimula a expressão de ENaC e a atividade da ATPase Na^+/K^+. O antagonista farmacológico da aldosterona é o diurético **espironolactona.**

A reabsorção de sódio, por sua vez, dirige o movimento da água. Os inibidores da reabsorção de sódio, como, por exemplo, os diuréticos tiazídicos (p. ex., hidroclorotiazida), os diuréticos de alça (p. ex., furosemida), o amiloride e a espironolactona, são extensivamente utilizados na prática clínica para induzir a natriurese e a diurese.

A reabsorção de glicose

Em condições normais, na presença de uma concentração plasmática média de glicose, cerca de 5 mmol/L (~100 mg/dL), aproximadamente 200 g de glicose são filtrados pelo rim diariamente. Em indivíduos saudáveis, toda a glicose filtrada é reabsorvida para a circulação, pelo que a urina não apresenta glicose. A reabsorção de glicose do filtrado nos túbulos contornados proximais envolve a participação de cotransportadores sódio-glicose (SGLTs). Existem duas proteínas cotransportadoras de glicose dependentes de sódio: o SGLT2, um transportador de baixa afinidade, mas de alta capacidade, que reabsorve 90% da glicose filtrada, e o SGLT1, um transportador de alta afinidade e baixa capacidade. O transporte de glicose mediado pelos SGLTs é um processo ativo, que utiliza energia proveniente do gradiente eletroquímico do sódio mantido pela ATPase Na^+/K^+. A glicose reabsorvida para as células epiteliais tubulares, através dos SGLTs, é liberada para a circulação pelos transportadores específicos de glicose (GLUT-1 e GLUT-2) localizados nas membranas basolaterais.

A reabsorção da glicose filtrada aumenta linearmente até que a capacidade máxima dos túbulos (T_{max}) seja excedida

O ponto de saturação do sistema de transporte, o limiar renal, é atingido quando a concentração plasmática de glicose é de 11,0 mmol/L (198 mg/dL) em indivíduos saudáveis. Acima dessa concentração, a porcentagem de glicose filtrada que é reabsorvida diminui e surge a glicosúria. Esse limiar está diminuído em indivíduos que possuem uma doença rara denominada **glicosúria renal familiar,** causada por um conjunto de mutações no gene SLC5A2, que codifica o SGLT2. Dependendo da natureza das mutações, os indivíduos afetados têm graus variáveis de glicosúria. Em suas formas mais graves, estes pacientes podem perder mais de 100 g de glicose por dia na urina.

O transporte renal de aminoácidos

Em humanos, a concentração plasmática total de aminoácidos é de aproximadamente 2,5 mmol/L (~25 mg/dL). Os aminoácidos plasmáticos livres são filtrados no glomérulo renal (aproximadamente 50 g por dia). Paralelamente, os aminoácidos são transportados para as células renais e são metabolizados. Por exemplo, a glutamina, transportada através quer da membrana luminal quer da membrana basolateral, é desaminada pela glutaminase. O produto desta reação, a amônia, é secretado para o lúmen tubular onde atua como tampão do íon hidrogênio (Cap. 25). No rim, a glutamina é também um substrato para a gliconeogênese.

A reabsorção quase completa dos aminoácidos filtrados é uma função de transporte fundamental do túbulo proximal. Seu transporte transepitelial desde o lúmen tubular, através da célula e para a circulação, é conduzido pelo gradiente eletroquímico do sódio. Na membrana luminal das células tubulares existem três tipos de cotransportadores de aminoácidos dependentes de sódio (pertencentes à família das proteínas transportadoras de solutos; SLC): um para **aminoácidos neutros** (glicina, alanina, prolina), um para **aminoácidos ácidos** (glutamato, aspartato) e um para **aminoácidos básicos** (cistina, arginina, ornitina, lisina). Seu transporte para fora da célula requer cotransportadores e antiportadores (estes últimos também pertencentes à família SLC). Cada aminoácido pode ser transportado por mais do que um transportador, fornecendo uma capacidade de reserva em caso de o transporte estar parcialmente comprometido. A elevação da excreção urinária de aminoácidos pode ser causada por mutações em genes que codificam o transportador de um aminoácido em particular, como acontece na **cistinose.**



Quadro clínico

Os diuréticos são usados no tratamento do edema, da insuficiência cardíaca e da hipertensão

Os diuréticos são fármacos que estimulam a excreção de água e sódio. Os **diuréticos tiazídicos,** por exemplo, a bendrofluazida, diminuem a reabsorção de sódio no túbulo distal ao bloquearem o cotransporte de sódio e cloreto. Os **diuréticos de alça,** como a

furosemida, inibem a reabsorção de sódio no ramo ascendente da alça de Henle. A **espironolactona,** um diurético poupador de potássio, é um inibidor competitivo da aldosterona: inibe a troca de sódio-potássio nos túbulos distais e diminui a excreção de potássio. Uma diurese osmótica pode ser induzida pela administração do poliol, **manitol.**

O efeito global do tratamento com diuréticos é o aumento do volume de urina e a perda de sódio e água. Os diuréticos são importantes no tratamento do edema associado a problemas da circulação, como insuficiência cardíaca, em que o comprometimento da função cardíaca pode levar a dispneia grave causada por edema pulmonar. Também são essenciais no tratamento da hipertensão.

Normalmente, apenas se encontram pequenas quantidades de aminoácidos na urina (0,7 g/24 h). Cada substância que é reabsorvida nos túbulos renais tem o seu próprio transporte renal máximo (T_{max}). O T_{max} pode ser excedido quando a quantidade da substância filtrada ultrapassa a capacidade do transporte ou quando as células tubulares têm um déficit funcional. Assim, a aminoacidúria pode resultar da acumulação no plasma de aminoácidos como a fenilalanina, a leucina, a isoleucina e a valina, ou por um comprometimento da função tubular. A aminoacidúria pode ser também um sinal de lesão tubular proximal **(síndrome de Fanconi)**.

O transporte renal de fosfato

A homeostasia do fosfato inorgânico (Pi) depende principalmente do balanço entre a absorção intestinal de Pi e sua excreção urinária. A adaptação do transporte renal de Pi às variações da quantidade de Pi da dieta está também bem documentada. O transporte renal do Pi depende de fatores hormonais e não hormonais. Variações na excreção urinária de Pi são geralmente resultantes de alterações na atividade do sistema de transporte tubular renal.

Aproximadamente 90% dos fosfatos do plasma são ultrafiltrados no glomérulo (10% do Pi se encontra ligado à albumina plasmática). A reabsorção do Pi filtrado ocorre no túbulo proximal, e até certo ponto no túbulo distal. O transporte de Pi através das células tubulares depende da magnitude do gradiente de sódio, formado pela ATPase Na^+/K^+ na membrana basolateral. Contudo, o fator limitante para o transporte de Pi é a abundância de proteínas de transporte específicas na membrana.

O transporte de Pi através da borda em escova membranar dos túbulos proximais renais é mediado por duas proteínas cotransportadoras de Pi dependentes de sódio, a NaPi-IIa e a NaPi-IIc (a NaPi-IIb é muito abundante na borda em escova membranar do intestino delgado). O NaPi-IIa é eletrogêneo, uma vez que o transporte de um íon Pi divalente está acoplado a três íons de sódio ($3Na^+:HPO_4^{2-}$). O NaPi-IIc, em oposição, é eletroneutro e acopla dois íons sódio a um íon Pi divalente ($2Na^+:HPO_4^{2-}$). A expressão de NaPi-IIa e NaPi-IIc adequa a reabsorção renal de Pi às necessidades do organismo. Por exemplo, a restrição dietética de Pi leva ao aumento da quantidade das proteínas NaPi-IIa e NaPi-IIc na membrana luminal. Em contraste, uma dieta com elevado teor de Pi leva

à diminuição da expressão do transportador. A expressão membranar de NaPi-IIa é regulada pelo **hormônio da paratireoide (PTH).** Os receptores de PTH estão localizados em ambas as membranas basolateral e luminal das células tubulares. A PTH ativa a adenilato ciclase através de seus receptores localizados na membrana basolateral, aumentando o AMP cíclico intracelular. O cAMP, por sua vez, ativa a proteína cinase A que vai fosforilar o transportador NaPi-IIa, levando à sua internalização (deslocação para o citosol). Ainda, através da ligação aos receptores luminais, a PTH causa a fosforilação da NaPi-IIa pela fosfolipase C e proteína cinase C, resultando, mais uma vez, na subsequente internalização do transportador NaPi-IIa. Todos esses processos levam a uma diminuição da disponibilidade dos transportadores para o Pi filtrado, pelo que sua excreção urinária aumenta.

Transporte de fármacos pelos transportadores de ânions orgânicos

O rim elimina produtos de degradação através de filtração e secreção para o fluido tubular. Também elimina xenobióticos hidrofílicos, como por exemplo, fármacos e respectivos metabólitos. O transporte ocorre nos túbulos proximais e é facilitado por transportadores tubulares específicos para o substrato. Os mais importantes são os transportadores de ânions orgânicos (OATs), que pertencem à família de transportadores ATP-*binding cassette* (ABC) ou dos transportadores de solutos (SLC).

Os **transportadores ABC** são proteínas transmembranares que utilizam a energia resultante da hidrólise de ATP para transportar vários substratos através das membranas, como por exemplo, metabólitos, íons inorgânicos, lipídios, esteróis, peptídios e fármacos. A classificação dos transportadores ABC baseia-se em sua sequência de aminoácidos e na organização do domínio ABC (Caps. 17 e 18). Os transportadores ABC são expressos em vários órgãos — p. ex., nos rins, fígado e intestino — e desempenham um papel fundamental na resistência tumoral, na **fibrose cística** (Cap. 10) e em outras doenças hereditárias, assim como no desenvolvimento de resistências a múltiplos fármacos (como a colchicina). A competição de fármacos pelos transportadores pode levar a efeitos tóxicos.



Quadro clínico

Patologias hereditárias do transporte no nefrônio

A **síndrome de Gitelman** resulta de mutações inativadoras no gene que codifica o cotransportador sódio-cloreto sensível às tiazidas (gene SLC12A3). É uma doença autossômica recessiva. Os indivíduos homozigóticos são geralmente normotensos. As alterações bioquímicas observadas são semelhantes aos efeitos adversos induzidos pelas tiazidas (p. ex., alcalose metabólica hipoclorêmica, hipocalemia, hipocalciúria e, por vezes, hipomagnesiemia).

A **síndrome de Bartter** constitui um grupo de defeitos hereditários no transporte de íons ao longo do ramo ascendente espesso da alça de Henle. A síndrome de Bartter neonatal está relacionada com uma mutação no gene do cotransportador sódio-potássio-cloreto sensível à furosemida (SLC12A2) ou no gene do canal de potássio do ramo ascendente espesso (ROMK/KCNJ1). A síndrome de Bartter clássica resulta da mutação do gene do canal de cloreto (CLCNKB). Os sintomas clínicos incluem poliúria e polidipsia, existindo também hipocalemia e alcalose.

A **cistinose** é o resultado de mutações inativadoras autossômicas recessivas nos genes SLC3A1 e SLC79A relacionados com o transporte de aminoácidos dibásicos. O SLC3A1 codifica o transportador de aminoácidos dibásicos (rBAT), que forma um heterodímero com o produto do gene SLC79A (B0, +AT1). Consequentemente, existe uma acumulação lisossomal de cistina e comprometimento da função dos túbulos proximais, o que leva à diminuição da reabsorção de glicose e fosfato.

A **superfamília SLC** inclui mais de 300 proteínas que possuem a capacidade de permutar íons orgânicos extracelulares com os intracelulares. Os transportadores SLC são subclassificados em transportadores de cátions orgânicos (OCTs — p. ex., nicotina, quinino), transportadores de ânions orgânicos (OATS — transportando, p. ex., lactato e succinato), e transportadores de cátions/*zwitterions* orgânicos (OCTNs). Estas proteínas são expressas nas membranas basolateral e luminal de vários tecidos epiteliais, incluindo o rim e o fígado.

Urina

Os rins excretam entre 0,5 litro e até mais de 10 litros de urina por dia, sendo o volume diário médio de 1-2 litros. O volume mínimo necessário para remover os produtos do metabolismo (principalmente o nitrogênio, excretado sob a forma de ureia) é de aproximadamente 0,5 L/24 h. A osmolalidade do filtrado glomerular ronda os 300 mmol/L e a osmolalidade da urina varia entre 80 a 1.200 mmol/L. Assim, a concentração máxima de urina que se pode atingir é quatro vezes superior. Inversamente, para a excreção de água em excesso, a urina pode ser diluída para valores inferiores à osmolalidade do plasma.

A análise da urina fornece informação clinicamente importante

A análise de urina (urinálise) nos laboratórios clínicos inclui a verificação da presença de proteínas, glicose, corpos cetônicos, bilirrubina, urobilinogênio e de vestígios de sangue. A medição da osmolalidade urinária avalia a capacidade de concentração do rim. A urina também é testada para a presença de leucócitos e de vários cristais ou depósitos. Investigações especializadas incluem a análise de aminoácidos, hormônios e outros metabólitos na urina.

Em situações normais, apenas são detectados vestígios de proteínas na urina. São detectadas quantidades aumentadas quando existe lesão glomerular: a presença de quantidades significativas de proteínas na urina é um sinal importante de **doença renal.**

Mesmo uma quantidade mínima de albumina na urina (microalbuminúria) é um sinal preditor do desenvolvimento de nefropatia diabética (Cap. 21). Proteínas maiores, como as imunoglobulinas, aparecem na urina quando a lesão é mais extensa: as cadeias leves das imunoglobulinas (proteína de Bence Jones) estão presentes na urina no **mieloma múltiplo** (Cap. 4). Em uma **anemia hemolítica,** a urina pode apresentar hemoglobina livre e urobilinogênio. A presença de mioglobina é um marcador de lesão muscular **(rabdomiólise).** A medição de glicose e cetonas na urina é importante na avaliação do controle glicêmico de pacientes **diabéticos** (Cap. 21). Medições de urobilinogênio e bilirrubina ajudam a determinar a **função hepática** (Cap. 29).

Avaliação da função renal

A taxa de filtração glomerular é a característica mais importante para descrever a função renal

A depuração renal é definida como o volume de plasma (em milímetros) do qual o rim elimina uma determinada substância por minuto. A taxa de filtração glomerular (TFG) é a característica mais importante para descrever a função renal. A TFG pode ser estimada medindo a depuração de uma substância, como o polissacárido inulina, que não seja secretada nem reabsorvida nos túbulos renais. A quantidade de inulina filtrada do plasma (isto é, sua concentração plasmática, P_{in}, multiplicada pela TFG) é igual à quantidade que é recuperada na urina (ou seja, sua concentração urinária, U_{in}, multiplicada pela taxa de formação de urina, V):

$$P_{in} \times \text{TFG} = U_{in} \times V$$

A partir da equação anterior calculamos a TFG: **(1)**

$$\text{TFG} = \text{U}_{in} \times V / P_{in}$$

A TFG média é de 120 mL/min em homens e de 100 mL/min em mulheres. A **(2)** depuração renal da inulina é igual à TFG.

A creatinina e ureia séricas são testes de primeira linha no diagnóstico de doença renal

Seria impraticável administrar inulina intravenosa sempre que se pretendesse avaliar a função renal. Na prática clínica, é utilizada como alternativa a depuração de creatinina.

A creatinina deriva da fosfocreatina do músculo esquelético

A depuração de creatinina é semelhante à da inulina. Apesar de haver alguma reabsorção de creatinina nos túbulos renais, isso é compensado por uma secreção tubular equivalente. Para calcular a depuração de creatinina são necessárias uma amostra de sangue e uma colheita da urina das 24 horas. Em primeiro lugar, são medidas as concentrações de creatinina sérica (P_{Cre}) e urinária (U_{Cre}). A taxa de excreção de urina é calculada dividindo o volume de urina pelo tempo de colheita (V, ver em cima). A depuração de creatinina é então calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Depuração de creatinina} = U_{Cre} \times V / P_{Cre}$$

A concentração sérica da creatinina é de 20-80 mmol/L (0,28-0,90 mg/dL). Um aumento na concentração sérica da creatinina reflete uma diminuição da TFG: a concentração sérica da creatinina duplica quando a TFG fica reduzida a 50%. Outro teste utilizado para avaliação da função renal é a medição da concentração sérica da **ureia.** No entanto, como a ureia é o produto final do catabolismo proteico, seu nível no plasma está também dependente de fatores como a ingestão proteica e a taxa de degradação tecidual.

Na prática clínica, a creatinina e ureia séricas são testes de primeira linha no diagnóstico de **insuficiência renal** (Fig. 23.8). A insuficiência renal leva à diminuição do volume de urina e da depuração da creatinina, e ao aumento da creatinina e ureia séricas. Os avanços nos testes laboratoriais incluem a padronização das medições de creatinina ao criar métodos utilizados nos laboratórios clínicos reproduzidos a partir do método de referência, a diluição isotópica por espectroscopia de massa.

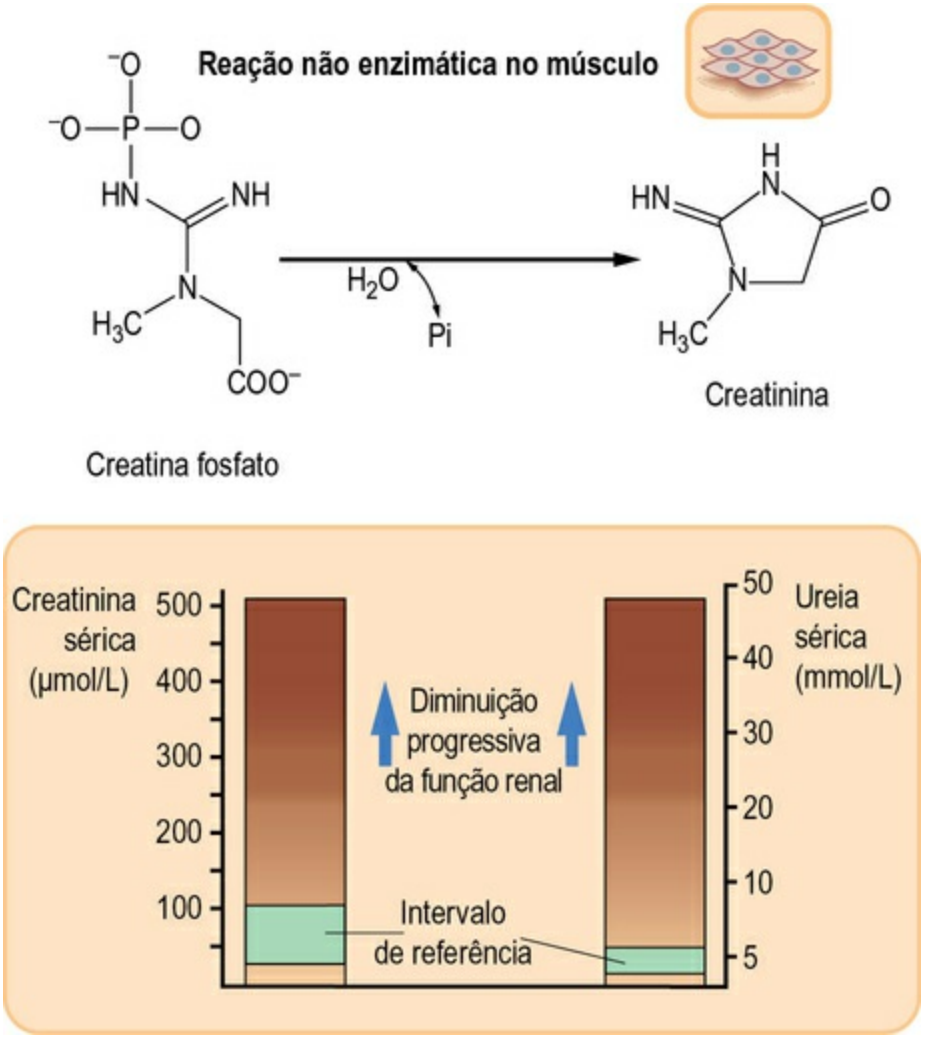


FIG. 23.8 As concentrações séricas de creatinina e ureia são marcadores importantes da função renal. O painel superior mostra a conversão da fosfocreatina muscular em creatinina. A perda de 50% dos nefrônios resulta aproximadamente na duplicação da concentração de creatinina sérica.

A concentração sérica de cistatina C é outro marcador da TFG

A cistatina C é uma proteína de 122 aminoácidos e 13 kDa pertencente à família dos inibidores das cisteína proteases. É o produto de um gene constitutivo expresso em todas as células nucleadas, e é produzida a uma velocidade constante. Devido ao seu tamanho pequeno e ao seu ponto isoelétrico básico, a cistatina C é filtrada livremente através dos glomérulos. A cistatina C não é secretada pelos túbulos e, apesar de ser reabsorvida, é subsequentemente catabolizada, e, como tal, não regressa ao plasma. Sua concentração sérica não é afetada significativamente pela idade, razão pela qual é o marcador preferencial da TFG em crianças. No entanto, outros fatores independentes da TFG, como os fenômenos inflamatórios, podem afetar a concentração sérica de cistatina C.

A lipocalina associada à gelatinase neutrofílica é um novo biomarcador de lesão renal aguda

A lipocalina associada à gelatinase neutrofílica (NGAL) é uma proteína de 178 aminoácidos e de 25 kDa pertencente à família das lipocalinas (do grego *lipos*, "gordura" e *calyx*, "cálice"). Essa proteína, produzida em várias células epiteliais (rim, fígado, pulmão, intestino) e em mielócitos, é um componente da imunidade inata. A NGAL

desempenha também um papel na remodelação tecidual, principalmente após heterodimerização com a metaloproteinase 9 (MMP-9, colagenase IV). A síntese e secreção para a corrente sanguínea da NGAL aumentam imediatamente após lesão tecidual.

A NGAL sérica é livremente filtrada nos glomérulos e é reabsorvida nos túbulos proximais. O aumento da NGAL sérica durante uma lesão renal aguda pode refletir uma redução da TFG. Apesar de a principal origem da NGAL urinária ser o nefrônio distal, uma pequena fração pode ser proveniente do filtrado, tendo escapado à reabsorção tubular, no contexto de uma lesão tubular proximal.

Estudos recentes demonstram uma relação quantitativa entre o estresse celular, a expressão de NGAL no rim e a excreção de NGAL na urina. As células do nefrônio distal são ativadas para expressar a NGAL poucas horas após uma lesão (p. ex., isquemia, hipoxia ou toxicidade farmacológica), antes que outro segmento do nefrônio possa ser afetado. A NGAL urinária também está sendo testada como um sinal mais precoce de lesão renal aguda antes do aparecimento de alterações clínicas evidentes. As limitações da medição da NGAL urinária como biomarcador de lesão renal aguda são o fato de esta poder ser afetada por doença renal crônica coexistente, por inflamação renal e por infecções do trato urinário.

A TFG estimada (eTFG)

A depuração da creatinina varia com a idade, superfície corporal, sexo e também com a raça. Além disso, a relação entre a TFG e a concentração de creatinina pode diferir entre indivíduos saudáveis e pacientes com patologia renal. Na prática clínica atual, os valores da TFG são ajustados usando fórmulas que incluem, além da concentração sérica de creatinina, fatores como a idade, o sexo, o peso e a raça.



Quadro clínico

Um homem de 25 anos admitido após acidente de moto: lesão renal aguda

Um homem de 25 anos foi admitido no hospital, inconsciente, após um acidente de moto. Apresentava evidência de choque com hipotensão e taquicardia, uma fratura craniana e múltiplas lesões nos membros. Apesar do tratamento intravenoso com sangue e coloides, o paciente mantinha oligúria persistente (débito urinário de 5-10 mL/h; considera-se oligúria se <20 mL/h).

Ao terceiro dia, sua concentração sérica de creatinina tinha subido para 300 µmol/L (3,9 mg/dL), e sua concentração de ureia para 21,9 mmol/L (132 mg/dL). Sua eTFG era de 22 mL/min/1,73 m^2. Os valores de referência são:

Creatinina sérica: 20-80 µmol/L (0,23-0,90 mg/dL).
Ureia sérica: 2,5-6,5 mmol/L (16,2-39 mg/dL).
eTFG: ver Tabela 23.2.

Tabela 23.2

Classificação da doença renal crônica

Estágio	Descrição	eTFG (mL/min/1,73 m^2)
1	Função renal normal, mas com achados na urina ou anomalias estruturais do rim*	≥90
2	Diminuição ligeira da TFG	60-89
3	Diminuição moderada da TFG	30-59
4	Diminuição grave da TFG	15-29
5	Doença renal terminal ou diálise	<15

A gravidade da doença renal crônica é categorizada em seis estágios. As eTFGs utilizadas nesta classificação derivam da equação MDRD abreviada. *Proteinúria, albuminúria, hematúria durante pelo menos três meses e/ou anomalias estruturais

Referência: KDOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification, and Stratification. (Ver Leituras Sugeridas para detalhes) Kidney Disease Outcome Quality Initiative, Am J Kidney Dis 39(suppl. 1):S1–S266, 2002.

Comentário

Este homem jovem desenvolveu lesão renal aguda devido a necrose tubular aguda como consequência do choque hipovolêmico. O paciente foi subsequentemente submetido a hemofiltração de emergência. A função renal começou a recuperar após duas semanas com um aumento inicial do volume de urina, a chamada "fase diurética".

Diferentes equações fornecem estimativas úteis da TFG: em adultos, as equações usadas são as desenvolvidas pelo *Modification of Diet in Renal Disease Study Group* (MDRD) e a equação de Cockcroft-Gault; em crianças são usadas as equações de Schwartz e de Counahan-Barratt. A conhecida "fórmula MDRD abreviada" inclui quatro variáveis: a creatinina sérica, a idade, o sexo e a raça. Além dessas variáveis, a equação MDRD original, com seis variáveis, incluía a albumina e a ureia séricas. Uma discussão pormenorizada dessas fórmulas está para além do âmbito deste livro — o leitor deve consultar a seção Leituras Sugeridas.

As equações de eTFG são úteis na detecção de insuficiência renal. O cálculo da TFG estimada é recomendado para a identificação e classificação, bem como para o rastreio e monitorização, de doença renal crônica. A gravidade da doença renal crônica é classificada em seis estágios (Tabela 23.2).

No entanto, em indivíduos com regimes dietéticos invulgares (veganismo, dieta vegetariana, suplementos de creatinina) ou massa muscular anormal (resultante de amputação, desnutrição ou perda de massa muscular), a função renal deve ser avaliada por medição da depuração de creatinina.



Quadro clínico

O diabetes resulta frequentemente em comprometimento da função renal

Uma mulher de 37 anos, com história de diabetes tipo 1 desde há 12 anos, recorreu a uma consulta de rotina de diabetes. Apresentava mau controle glicêmico e hemoglobina glicada (HbA_{1c}) de 8% (64 mmol/mol). Sua pressão arterial estava ligeiramente elevada, 145/88 mmHg. A análise quantitativa da albumina na urina revelou uma concentração de proteína de 5 mg/mmol de creatinina, indicando a presença de microalbuminúria. Os valores de referência são:

HbA_{1c}: valores desejáveis abaixo de 7% (53 mmol/mol).

Microalbumina urinária: inferior a 3,5 mg/mmol de creatinina.

Comentário

Esta paciente apresenta um comprometimento ligeiro da função renal e pressão arterial elevada como resultado da lesão glomerular provocada pelo diabetes. A presença de microalbuminúria é um preditor de futura nefropatia diabética clinicamente evidente.

Resumo

- Os rins mantêm a homeostasia da água e dos eletrólitos e desempenham, portanto, um papel fundamental na regulação da composição e volume do fluido extracelular. O transporte de sódio pelos rins é também um dos principais determinantes da pressão arterial.
- Os rins são expostos ao estresse mecânico induzido pela hipertensão, à hiperglicemia e a várias nefrotoxinas que podem lesar as células renais e comprometer a função renal. Assim, a avaliação da função renal é uma parte importante do exame clínico.
- As concentrações séricas da ureia e da creatinina são exames-chave na avaliação da função renal. Para uma avaliação mais exata da função renal utiliza-se a depuração da creatinina.
- A proteinúria é um sinal de lesão da barreira de filtração renal. A microalbuminúria é um marcador precoce de nefropatia; a NGAL na urina é um marcador precoce de lesão renal aguda.

Leituras sugeridas

Broer, S. Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. *Physiol Rev*. 2008; 88:249–286.

Burckhardt, G. Drug transport by Organic Anion Transporters (OATs). *Pharmacol Thera*. 2012; 136:106–130.

Chadha, V., Alon, U. S. Hereditary renal tubular disorders. *Semin Nephrol*. 2009; 29:399–411.

Devarajan, P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a promising biomarker for human acute kidney injury. *Biomark Med*. 2010; 4:265–280.

Haraldsson, B., Nystrom, J., Deen, W. M. Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. *Physiol Rev*. 2008; 88:451–487.

Mather, A., Pollock, C. Glucose handling by the kidney. *Kidney Int*. 2011; 79(suppl 120):S1–S6.

Murer, H., Biber, J. Phosphate transport in the kidney. *J Nephrol*. 2010; 23(Suppl 16):S145–S151.

Schlaich, M. P., Sobotka, P. A., Krum, H., et al. Renal denervation as a therapeutic approach for hypertension.

Hypertension. 2009; 54:1195–1201.

Sites

KDOQI Clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. Part 5. Evaluation of laboratory measurements for clinical assessment of kidney disease. Guideline 4. Estimation of GFR www.kidney.org/professionals/kdoqi/guidelines_ckd/p5_lab_g4.htm Kidney Disease Outcome Quality Initiative, Am J Kidney Dis 39(suppl. 1):S1-S266, 2002.

KDOQI Clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. Part 5. Evaluation of laboratory measurements for clinical assessment of kidney disease. Guideline 4. Estimation of GFR www.kidney.org/professionals/kdoqi/guidelines_ckd/p5_lab_g4.htm

MDRD eGFR calculator: www.nephron.com/MDRD_GFR.cgi

UniProt Protein knowledge base: www.uniprot.org/

CAPÍTULO 24

Homeostase da Água e de Eletrólitos

Marek H. Dominiczak and Mirosława Szczepaska-Konkel

Objetivos

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever os compartimentos hídricos do corpo no adulto e a composição dos principais líquidos corporais.
- Explicar o papel da albumina no movimento da água entre o plasma e o espaço intersticial, incluindo as consequências da proteinúria.
- Descrever de que maneira o sódio influencia o movimento da água entre o espaço extracelular e intracelular.
- Explicar por que a bomba sódio-potássio ATPase é essencial para a hidratação normal da célula e comentar sobre as consequências de sua inibição.
- Descrever os fatores que afetam a concentração plasmática de potássio.
- Discutir as interações entre a homeostase do sódio e da água.
- Descrever a avaliação clínica das condições hidroeletrolíticas.

Introdução

A água e os eletrólitos são constantemente trocados com o ambiente, e o conteúdo dos mesmos no corpo depende do balanço entre a ingestão e a perda

A água é essencial para a sobrevivência e corresponde a aproximadamente 60% do peso corporal no adulto. Essa porcentagem se modifica com a idade: é cerca de 75% no recém-nascido e diminui para menos de 50% nas pessoas mais idosas. O tecido cerebral é o que possui maior quantidade de água (quase 90%) e o tecido adiposo, a menor (10%).

A estabilidade das estruturas subcelulares e as atividades de diversas enzimas são dependentes de uma hidratação celular adequada. A manutenção dos gradientes iônicos e do potencial elétrico através das membranas também é crucial para a sobrevivência e

para a contração muscular, condutibilidade neuronal e processos secretórios (Cap. 8).

Tanto a deficiência de água quanto o seu excesso comprometem a função dos órgãos e dos tecidos. O balanço hídrico (ingestão e perda diárias) e a distribuição de água entre as células e o fluido circundante estão sujeitos a uma regulação complexa.

Relevância clínica

Os distúrbios hidroeletrolíticos são comuns na prática clínica. Historicamente, os livros de bioquímica (e muitos cursos de bioquímica) abordavam o equilíbrio hídrico e eletrolítico de forma algo superficial. E, no entanto, este é fundamental à manutenção do metabolismo e está subjacente a muitos procedimentos terapêuticos essenciais.

Compartimentos hídricos do corpo

Aproximadamente dois terços da água corporal total se encontram no líquido intracelular (LIC) e um terço permanece no líquido extracelular (LEC). O LEC consiste no líquido intersticial e na linfa (15% do peso corporal), plasma (3% do peso corporal) e líquidos transcelulares, que incluem o líquido gastrintestinal, urina e líquido cefalorraquidiano (LCR) (Fig. 24.1). Duas barreiras são importantes para o entendimento das trocas que ocorrem entre diferentes compartimentos: a membrana celular e a parede do capilar.

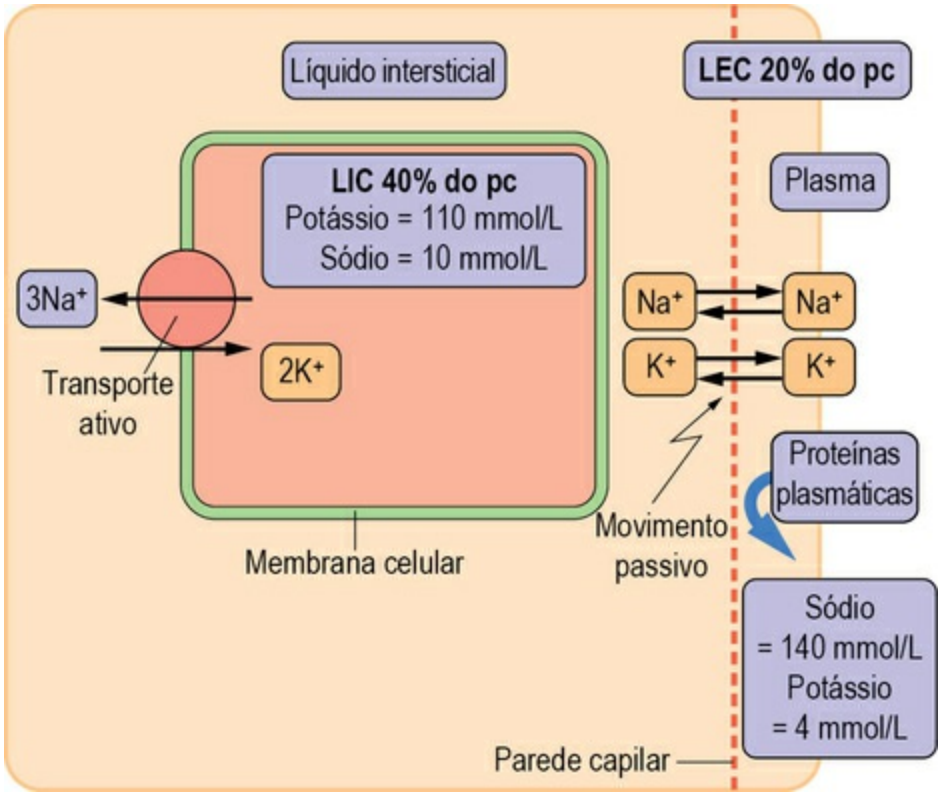


FIG. 24.1 Distribuição de água, sódio e potássio no organismo.
Os principais compartimentos de água no corpo são o líquido intracelular (LIC) e o líquido extracelular (LEC). O LEC inclui o líquido intersticial e o plasma. O gradiente de concentração de sódio e potássio é mantido através das membranas celulares pela bomba de Na^+/K^+-ATPase. O sódio é o principal contribuinte para a osmolalidade do LEC e um determinante da distribuição de água entre o LEC e o LIC. A distribuição de água entre o plasma e o líquido intersticial é determinada pela pressão oncótica exercida pelas proteínas plasmáticas. pc, peso corporal.

A parede do capilar separa o plasma do líquido intersticial

A parede do capilar separa o plasma do fluido intersticial e é livremente permeável à água e eletrólitos, mas não às proteínas. Íons e moléculas de baixo peso molecular estão presentes em concentrações semelhantes no LEC e no plasma, mas a concentração de proteínas no plasma é quatro a cinco vezes maior do que a do líquido intersticial. A concentração plasmática total de cátions é de cerca de 150 mmol/L, dos quais o sódio é aproximadamente 140 mmol/L e o potássio 4 mmol. Os ânions plasmáticos mais abundantes são o cloreto e o bicarbonato, com concentrações médias de 100 mmol/L e 25 mmol/L, respectivamente (Fig. 24.2). Considera-se, para fins de equilíbrio eletrolítico, que na prática clínica o restante dos ânions, em conjunto, constitua o chamado *anion gap* (AG), que é calculado da seguinte maneira:

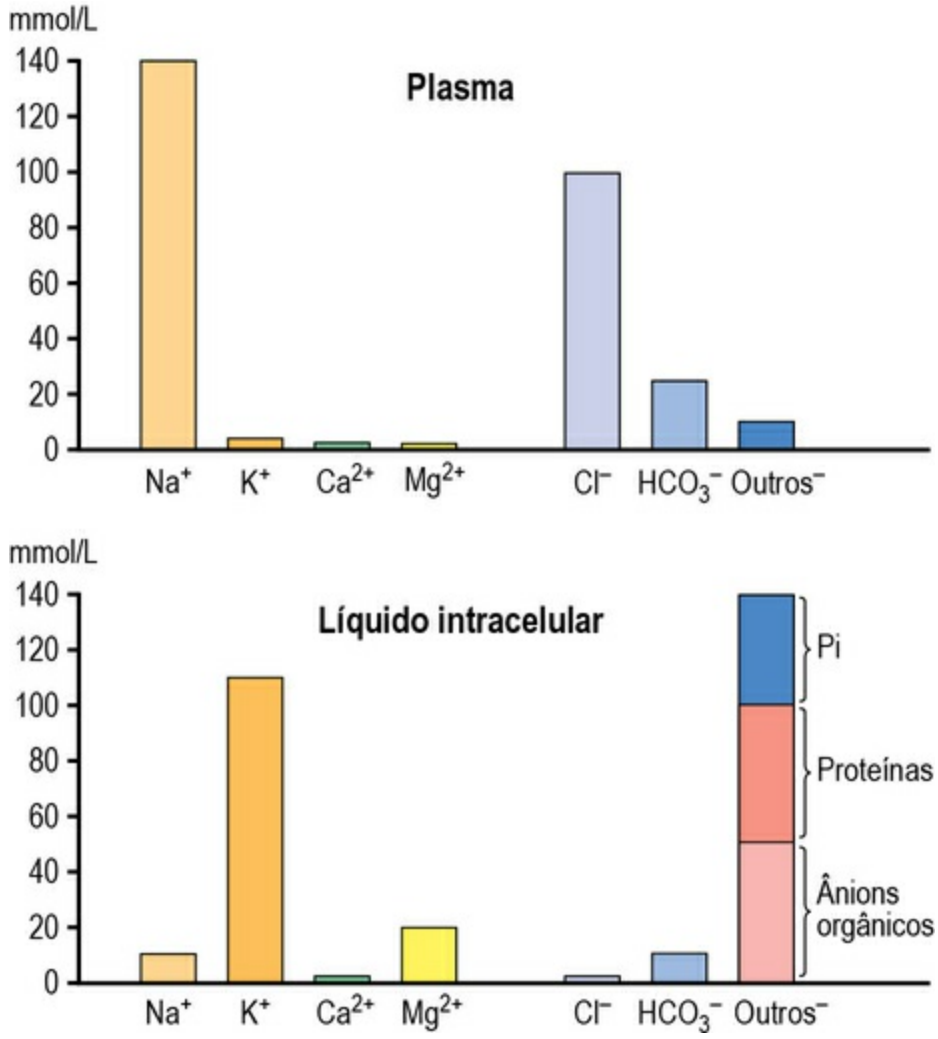


FIG. 24.2 Íons presentes no plasma e no líquido intracelular.
Os íons mais importantes no plasma são sódio, potássio, cálcio, cloreto, fosfato e bicarbonato. O cloreto de sódio, em uma concentração próxima de 0,9% (portanto, "fisiológica"), é o principal componente iônico do LEC. O potássio é o principal cátion intracelular. A glicose e a ureia contribuem para a osmolalidade plasmática. Normalmente, sua contribuição é pequena, porque estão presentes no plasma em concentrações molares relativamente pequenas (cerca de 5 mmol/L cada). Contudo, quando a concentração de glicose aumenta no diabetes, sua contribuição para a osmolalidade se torna importante. A concentração plasmática da ureia aumenta na insuficiência renal, mas ela não contribui para o movimento de água entre o LEC e o LIC porque atravessa livremente as membranas celulares. O principal cátion intracelular é o potássio e os principais ânions são os fosfatos e as proteínas. Existe também uma quantidade substancial de magnésio nas células.

Quadro clínico

Concentrações de íons no plasma e no soro

Todos os fenômenos fisiológicos ocorrem no plasma — e, como tal, a discussão das condições fisiológicas ou patológicas se relaciona com as concentrações plasmáticas de íons.

Contudo, na prática, a concentração da maioria dos íons é dosada depois de o sangue colhido ter coagulado (isto é, usando o soro). Assim, na discussão de resultados laboratoriais, mencionamos frequentemente valores séricos (Cap. 4).

$$AG = (Na^+ + K^+) - (Cl^- + HCO_3^-)$$

O *anion gap* (em uma pessoa saudável, aproximadamente 10 mmol/L) inclui o fosfato, sulfato, proteína e ânions orgânicos como lactato, citrato, piruvato, acetoacetato e β-hidroxibutirato. Contudo, pode aumentar diversas vezes em condições nas quais se acumulam ânions inorgânicos e orgânicos, por exemplo, na insuficiência renal ou na cetoacidose diabética. Por este motivo, ele é importante clinicamente.

A membrana plasmática separa o líquido intracelular do extracelular

No LIC, o principal cátion é o potássio, presente em uma concentração próxima de 110 mmol/L, o que é quase 30 vezes acima do que encontramos no LEC e no plasma (4 mmol/L). Os principais ânions no LIC incluem proteínas e fosfato. No LEC, a situação é inversa: o principal cátion é o sódio, presente em uma concentração próxima de 145 mmol/L. No LIC a concentração de sódio (e cloreto) é cerca de apenas 10 mmol/L.

A água se difunde livremente através da maioria das membranas celulares, mas o movimento de íons e de moléculas neutras é restrito

Pequenas moléculas são transportadas através de membranas por proteínas transportadoras específicas, as bombas iônicas. A mais importante é a sódio-potássio ATPAse (Na^+/K^+-ATPase), também conhecida por bomba sódio-potássio.

A Na^+/K^+-ATPase mantém os gradientes de sódio e de potássio através da membrana celular

A bomba de Na^+/K^+ATPase pode ser considerada ou como um transportador de íons (bomba de sódio), ou como uma enzima (ATPase). Ela mantém o potencial elétrico e o gradiente químico (eletrogênica) através da membrana (Fig. 24.3). Ela hidrolisa uma molécula de ATP e a energia liberada é utilizada para transferir três íons de sódio para fora da célula e colocar dois íons de potássio no interior da mesma (Fig. 24.4).

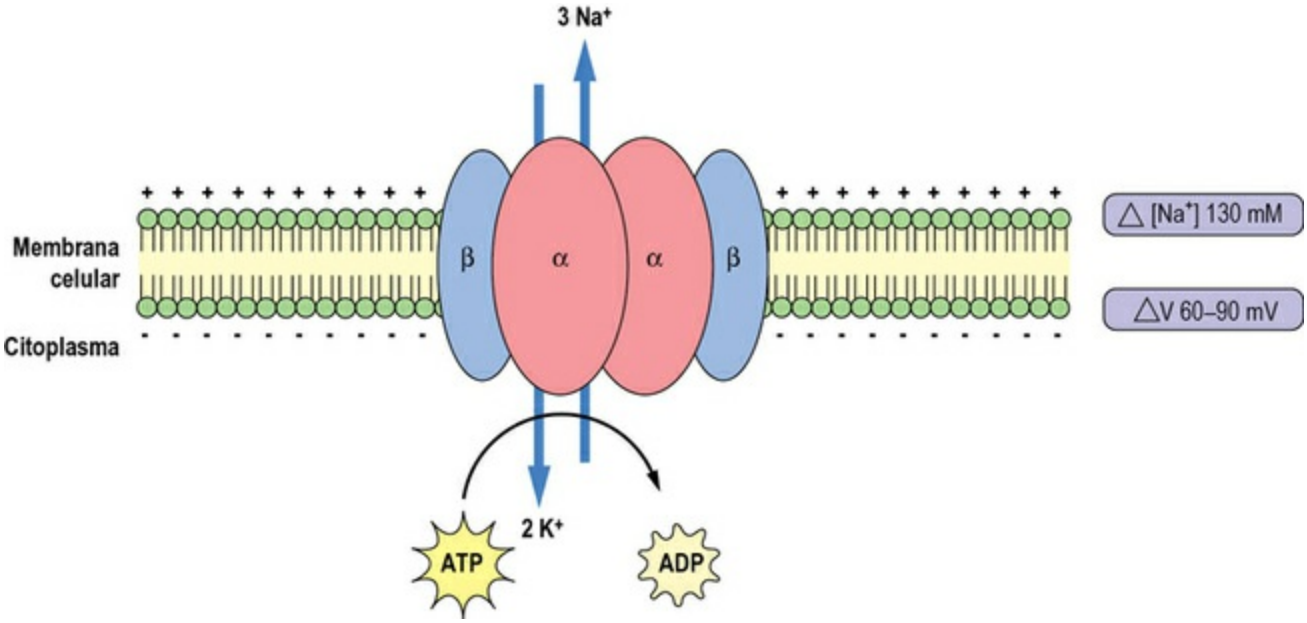


FIG. 24.3 A Na+/K+-ATPase (bomba de sódio-potássio) gera um potencial transmembrana e um gradiente de concentração iônica através das membranas celulares.
A diferença transmembranar na concentração de sódio (ΔNa^+) e a diferença de voltagem transmembranar (ΔV) são apresentadas à direita. Para cada molécula de ATP hidrolisada, são movidos dois íons potássio para o interior da célula e três íons sódio para fora da célula. A Na^+/K^+-ATPase consiste em duas subunidades principais — subunidade catalítica (α) e subunidade estrutural (β).

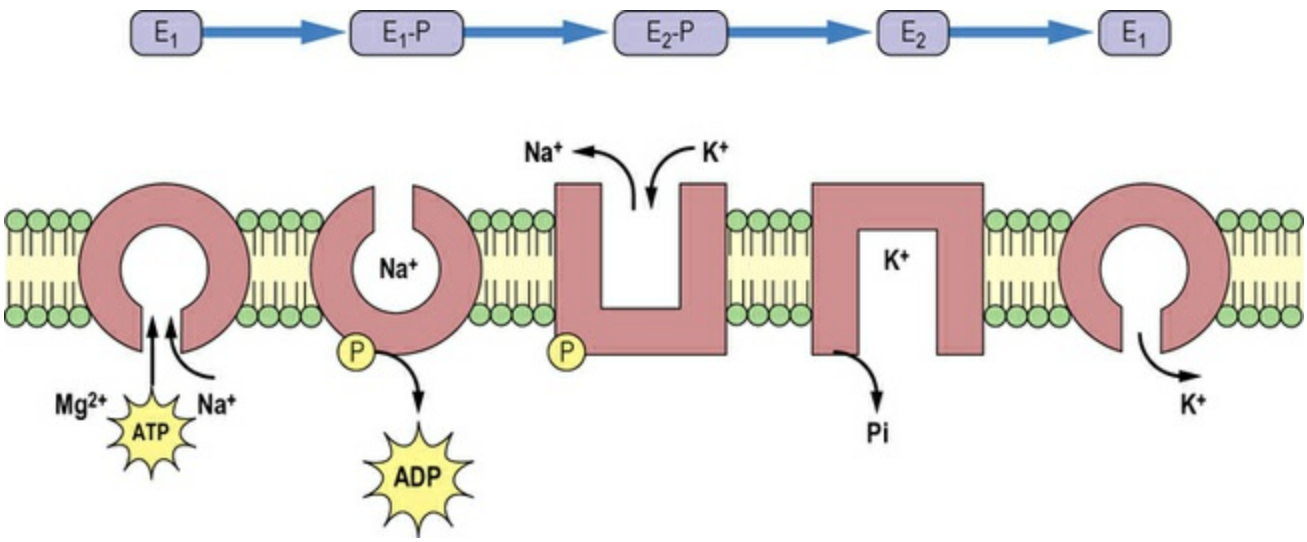


FIG. 24.4 Função catalítica da Na+/K+-ATPase.
A subunidade catalítica da Na^+/K^+-ATPase pode estar fosforilada (E_1-P e E_2-P) ou defosforilada (E_1 e E_2) e isto altera sua conformação e afinidade pelos substratos. A forma E_1 exibe alta afinidade pelo ATP, magnésio e sódio e baixa afinidade pelo potássio, enquanto a forma E_2 exibe alta afinidade pelo potássio e baixa pelo sódio. Após a liberação do ADP, ocorre mudança conformacional de E_1-P para E_2-P. Isto promove a liberação do sódio para o meio extracelular e a ligação do potássio extracelular. Este último processo induz desfosforilação de E_2-P e liberação do potássio no compartimento intracelular.

A bomba de Na^+/K^+-ATPase é a principal determinante da concentração citoplasmática de sódio (Cap. 8). Ela exerce uma função importante na regulação do volume celular, do pH citoplasmático e dos níveis de cálcio por meio dos transportadores Na^+-H^+ e Na^+-Ca^{2+}.

Um dos primeiros requisitos para adaptações contínuas realizadas pela bomba de sódio vem de alterações no sódio e no potássio da dieta. Hormônios que controlam o volume e a composição iônica do LEC normalmente agem diretamente na bomba de sódio no rim e no intestino.

A atividade da Na^+/K^+ ATPase é sujeita a regulação a curto e longo prazo por vários hormônios

A Na^+/K^+ ATPase é ativada pelo sódio e pelo ATP nos sítios citoplasmáticos. As estruturas da subunidade catalítica da enzima e de seus sítios de fosforilação estão ilustradas na Figura 24.5. A ativação médio-máxima da enzima pelo sódio intracelular ocorre a concentrações de sódio de 10-40 mM, que se encontram frequentemente acima da concentração do estado estacionário. Por conseguinte, pequenas alterações na concentração plasmática de sódio podem ter um grande efeito em sua atividade. Alguns hormônios parecem alterar a atividade da Na^+/K^+ ATPase por alteração de sua afinidade aparente pelo sódio (por exemplo, a angiotensina II e a insulina aumentam a afinidade).

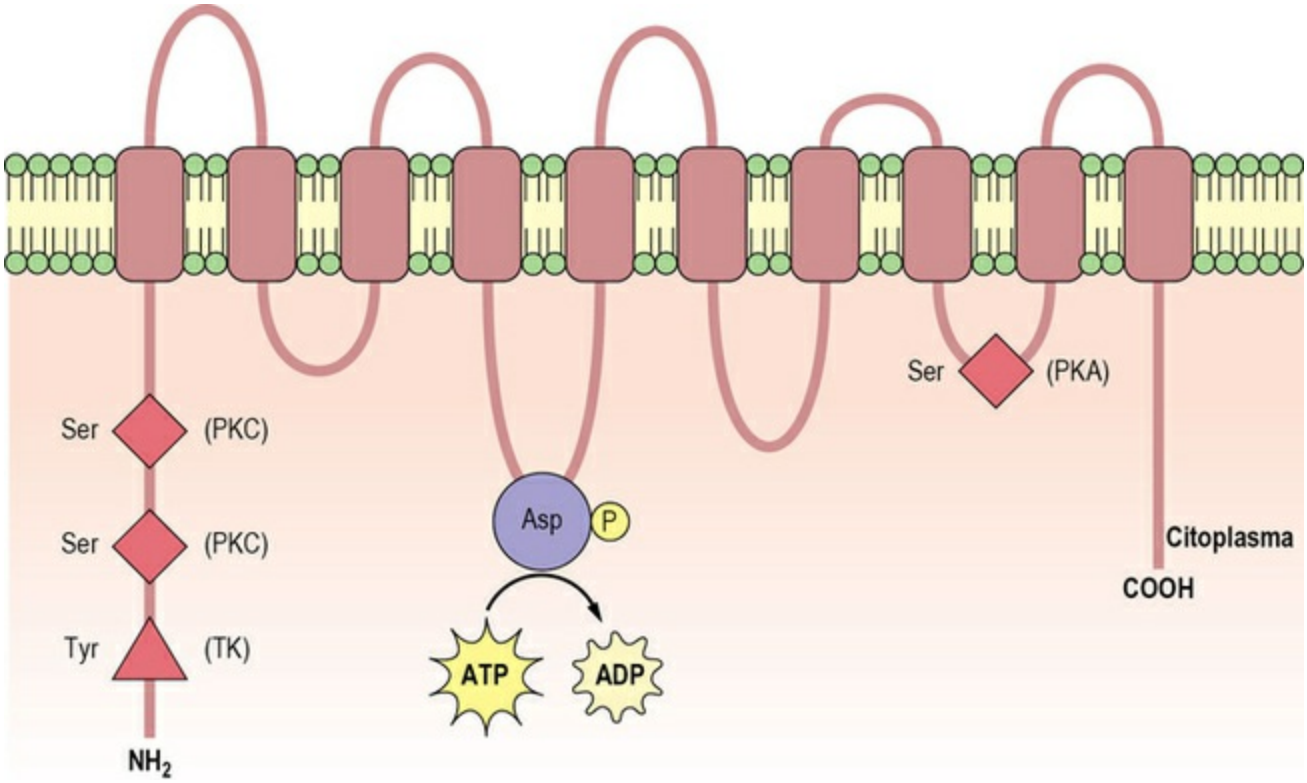


FIG. 24.5 Estrutura da subunidade α da Na+/K+-ATPase.
A subunidade α consiste em 10 domínios transmembrana (M1-M10) com os domínios amino e carboxiterminais intracelulares. O domínio que liga o ATP e o local de fosforilação estão localizados na longa alça citoplasmática M4-M5 (onde o resíduo de Asp é fosforilado). Outros locais de fosforilação, em resíduos de serina e tirosina, são mediados pela proteína cinase A (PKA), proteína cinase C (PKC) e tirosina cinase (TK).

A Na^+/K^+ ATPase está sujeita a regulação por vários hormônios, incluindo a aldosterona. A regulação a curto prazo envolve os efeitos diretos nas propriedades cinéticas da enzima ou sua translocação entre a membrana plasmática e os estoques intracelulares. Os mecanismos de regulação a longo prazo afetam a síntese ou a

degradação da enzima.

Os hormônios peptídicos, como a vasopressina e a PTH, que atuam através de receptores acoplados a proteínas G, afetam a atividade da Na^+/K^+ ATPase. As proteínas G ativam a adenilato ciclase, que produz cAMP. O cAMP, por sua vez, ativa a proteína cinase A (PKA). A PTH, a angiotensina II, a norepinefrina e a dopamina também despoletam a ativação, mediada pelas proteínas G, da fosfolipase C, que ativa a proteína cinase C (PKC). Tanto a PKA quanto a PKC afetam a Na^+/K^+ ATPase por fosforilação de serinas em sua subunidade α (Fig. 24.5). A insulina aumenta a afinidade aparente da Na^+/K^+ ATPase pelo sódio através da ativação do receptor tirosina cinase e da fosforilação da subunidade α da enzima.

O movimento passivo de eletrólitos através de canais iônicos é dirigido pelo gradiente eletroquímico

Para a maioria das células, o potencial de membrana varia entre 50 e 90 mV, sendo negativo no interior da célula. O gradiente eletroquímico é uma fonte de energia para o transporte de muitas substâncias, como o cotransporte de íons sódio com a glicose (o transportador SGLT, Cap. 10), aminoácidos e fosfato. A despolarização da membrana também promove um aumento do cálcio intracelular por ativação de canais de Ca^{2+} controlados por voltagem (Cap. 8). O papel dos gradientes iônicos na transmissão nervosa é descrito no Capítulo 41.

Uma vez que o transporte de água e sódio no lado luminal das células epiteliais (no intestino e nos rins) está associado ao gradiente iônico gerado pela Na^+/K^+ ATPase, esta enzima é crítica para a absorção de água no intestino e sua reabsorção nos rins. O comprometimento da função da bomba de sódio no rim e no intestino delgado está associado à patofisiologia da hipertensão e à diarreia crônica, respectivamente.

Osmolalidade: pressões osmótica e oncótica

As moléculas dissolvidas em água corporal contribuem para a pressão osmótica

A osmolalidade depende da concentração de moléculas na água, e a pressão osmótica é proporcional à concentração molal de uma solução. Um milimol de uma substância dissolvida em 1 kg de H_2O a 38°C exerce uma pressão osmótica de aproximadamente 19 mmHg. Em condições fisiológicas, a concentração média de todas as substâncias osmoticamente ativas no líquido extracelular é de 290 mmol/kg H_2O. Normalmente, a osmolalidade do líquido intracelular é idêntica.

Diferenças na osmolalidade causam movimento de água entre os fluídos intracelular e extracelular

A alteração na concentração de íons osmoticamente ativos no líquido extracelular ou intracelular cria um gradiente de pressão osmótica e, consequentemente, causa o movimento de água. **A água se difunde sempre da menor osmolalidade para a maior, para igualar as pressões osmóticas** (Fig. 24.6).

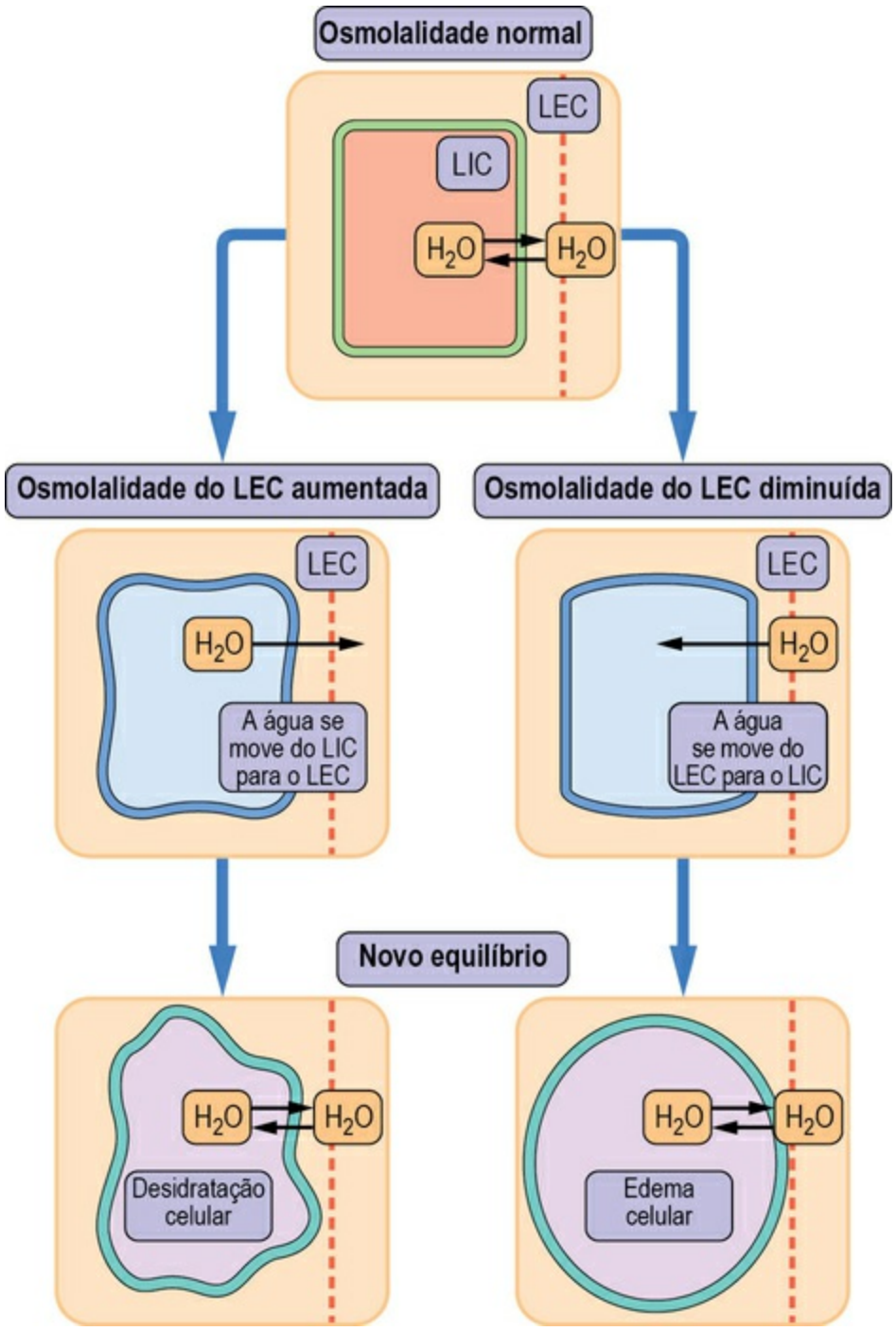


FIG. 24.6 Redistribuição de água causada por alterações na osmolalidade.
A pressão osmótica controla o movimento de água entre os compartimentos. Um aumento na osmolalidade do LEC leva à retirada de água das células e desidratação celular. Por sua vez, quando a osmolalidade do LEC diminui, a água se move do LEC para as células, podendo causar edema celular. As setas indicam a direção do movimento da água. LEC, líquido extracelular; LIC, líquido intracelular.

Uma vez que o sódio é o íon mais abundante no líquido extracelular, é também o determinante mais importante de sua osmolalidade. A glicose, na sua concentração plasmática normal (5 mmol/L; 90 mg/dL), não contribui significativamente para a osmolalidade, mas se torna seu principal determinante quando sua concentração aumenta no diabetes (recorde os "sintomas osmóticos" no diabetes mal controlado [Cap. 21]).

O balanço entre as pressões oncótica e hidrostática se altera ao longo do leito

vascular e é fundamental para a circulação de substratos e nutrientes

O movimento de água entre o plasma e o fluido intersticial depende da concentração plasmática de proteínas. As proteínas, em particular a albumina, exercem pressão osmótica no plasma (cerca de 3,32 kPa; 25 mmHg). Esta é conhecida como **pressão oncótica** e retém água no leito vascular. É equilibrada pela **pressão hidrostática,** que força o fluido na direção oposta, isto é, para o exterior dos capilares. Na parte arterial dos capilares, a pressão hidrostática prevalece sobre a pressão oncótica, e a água e os compostos de baixo peso molecular são filtrados para o espaço extravascular. Em contraste, na parte venosa dos capilares, a pressão oncótica prevalece sobre a pressão hidrostática, e o fluido é direcionado para o lúmen vascular (Fig. 24.7). A redução na pressão oncótica plasmática, que ocorre, por exemplo, como consequência de um decréscimo na concentração de albumina plasmática, resulta no movimento de fluido para o espaço extravascular e no desenvolvimento de edema.

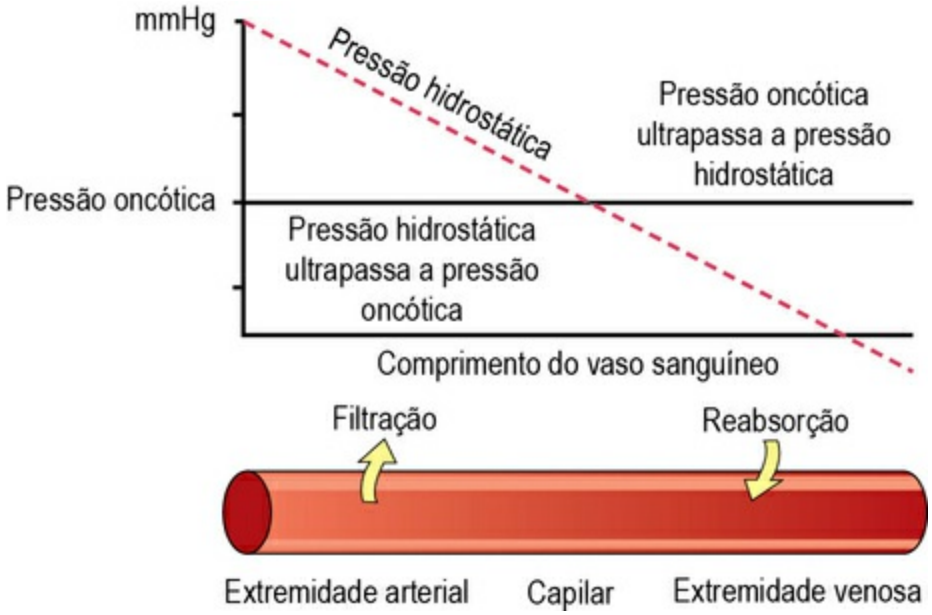


FIG. 24.7 As pressões oncótica e hidrostática determinam o movimento do líquido entre o plasma e o líquido intersticial.

Quadro clínico

O edema resulta de perda de proteínas

Uma menina com 8 anos foi encaminhada a um nefrologista após ter apresentado edema de face e tornozelos por um período de cerca de duas semanas. A fita de teste para pesquisa de proteína na urina mostrou um resultado fortemente positivo (++++) e a dosagem de proteína na urina coletada por 24 horas mostrou excreção de proteína de 7 g/dia. O valor de referência para excreção de proteína urinária é inferior a 0,15 g/dia.

Comentário

A causa da proteinúria foi o dano da barreira de filtração renal. A biopsia renal

demonstrou a chamada doença de lesão mínima, com perda de proteína na urina causando, por sua vez, hipoalbuminemia e diminuição da pressão oncótica plasmática. Isto levou ao edema. A condição entrou em remissão após tratamento com um glicocorticoide.

As células se protegem a si mesmas contra alterações de osmolalidade e volume

Um aumento na concentração intracelular de sódio estimula a Na^+/K^+-ATPase, que expulsa sódio da célula. Isto é seguido pela saída de água e protege a célula de alterações de volume. Outro mecanismo protetor é a produção intracelular de substâncias osmoticamente ativas. Por exemplo, as células cerebrais se adaptam à osmolalidade aumentada do líquido extracelular por aumento de sua concentração de aminoácidos, e as células na medula renal expostas a um ambiente hiperosmótico produzem um álcool osmoticamente ativo, o sorbitol, e aumentam a concentração do aminoácido taurina.

O corpo constantemente realiza trocas de água com o ambiente

Em estado de equilíbrio, a ingestão de água equivale à sua perda. A principal fonte de água é a ingestão oral e o principal mecanismo de perda é a excreção de urina. Perdemos também água pelos pulmões, transpiração e fezes: trata-se da chamada perda "insensível" de água, que em circunstâncias normais se eleva em cerca de 500 mL por dia (Fig. 24.8). A perda insensível de água pode aumentar substancialmente em temperaturas elevadas, durante exercício intenso, e também como consequência de diarreia ou febre. A monitorização do equilíbrio de fluidos do paciente é uma das rotinas diárias essenciais nas enfermarias médicas e cirúrgicas.

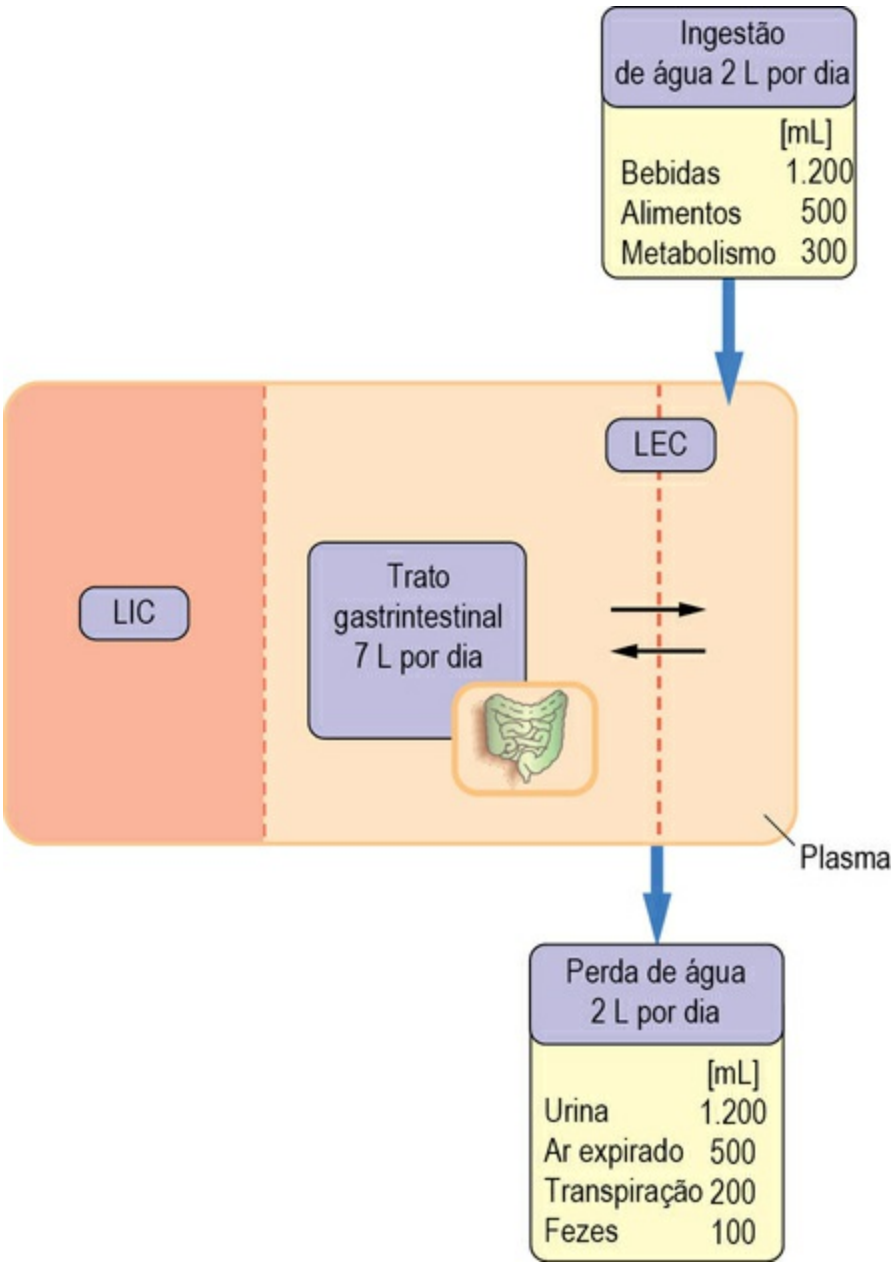


FIG. 24.8 Balanço hídrico diário em uma pessoa adulta.
A água é obtida da dieta e do metabolismo oxidativo e é perdida através dos rins, pele, pulmões e intestino. Observe o volume de água que entra e sai do trato gastrintestinal diariamente; isto explica por que uma diarreia grave leva rapidamente à desidratação. Ver também Capítulo 10.

Quadro clínico

Os líquidos corporais diferem em sua composição iônica

Anormalidades clínicas que podem se desenvolver após perda de líquidos corporais dependem da composição do que é perdido. Por exemplo, o líquido perdido na **transpiração** contém menos sódio do que o líquido extracelular: portanto, a transpiração excessiva leva a uma perda predominante de água e concentra o sódio no líquido extracelular, causando hipernatremia. Por sua vez, o teor do sódio do **líquido intestinal** é similar ao do plasma, mas contém quantidades consideráveis de potássio. Assim, a perda de líquido intestinal (p. ex., na diarreia grave) resulta em desidratação e

hipocalemia, mas pode não afetar a concentração de sódio plasmático (Tabela 24.1).

Tabela 24.1

Composição iônica dos líquidos corporais

	Sódio (mmol/L)	Potássio (mmol/L)	Bicarbonato (mmol/L)	Cloreto (mmol/L)
Plasma	140	4	25	100
Suco gástrico				
Fluido do intestino delgado	140	10	Variável	70
Fezes na diarreia	50–140	30–70	20–80	Variável
Bile, líquido pleural e peritoneal	140	5	40	100
Suor	12	10	–	12

Perda de líquido corporal com conteúdo eletrolítico semelhante ao do plasma leva à desidratação com concentração normal de eletrólitos no plasma. Por sua vez, quando o conteúdo de sódio no líquido perdido é menor que o do plasma (p. ex., suor), a desidratação pode ser acompanhada de hipernatremia. A hiper-hidratação é geralmente acompanhada de hiponatremia.

Adaptado com permissão de Dominiczak MH, editor: Seminars in Clinical Biochemistry, ed. 2, Glasgow, 1997, Glasgow University.

Potássio

É de fundamental importância monitorar a concentração sérica de potássio

A concentração normal do potássio no soro é 3,5-5 mmol/L. Como a concentração intracelular do potássio é muito maior do que no plasma, alterações relativamente pequenas na concentração de potássio entre o LEC e o LIC podem resultar em alterações importantes em sua concentração no soro. Tanto concentrações baixas quanto altas de potássio (hipocalemia e hipercalemia, respectivamente) afetam o músculo cardíaco e podem colocar a vida em risco.

No ECG, a hipercalemia pode levar à perda da onda P, ondas T com picos caracteristicamente altos e complexos QRS alargados. A hipocalemia, por outro lado, pode prolongar o intervalo PR, causar uma onda P com um pico mais alto, achatar a onda T e causar ondas U proeminentes.

Concentrações séricas de potássio inferiores a 2,5 mmol/L ou acima de 6,0 mmol/L são perigosas (Fig. 24.9). A causa mais comum de hipercalemia grave é a insuficiência renal: nesta condição, o potássio não pode ser adequadamente excretado na urina. Por sua vez, a concentração sérica de potássio baixa resulta de perdas excessivas ou na urina ou através do trato gastrintestinal. Os rins contribuem com mais de 90% da perda do potássio corporal e a terapia com diuréticos pode induzir tanto hipo como hipercalemia. Alterações na concentração do potássio no soro também estão associadas a alterações acidobásicas (Cap. 25).

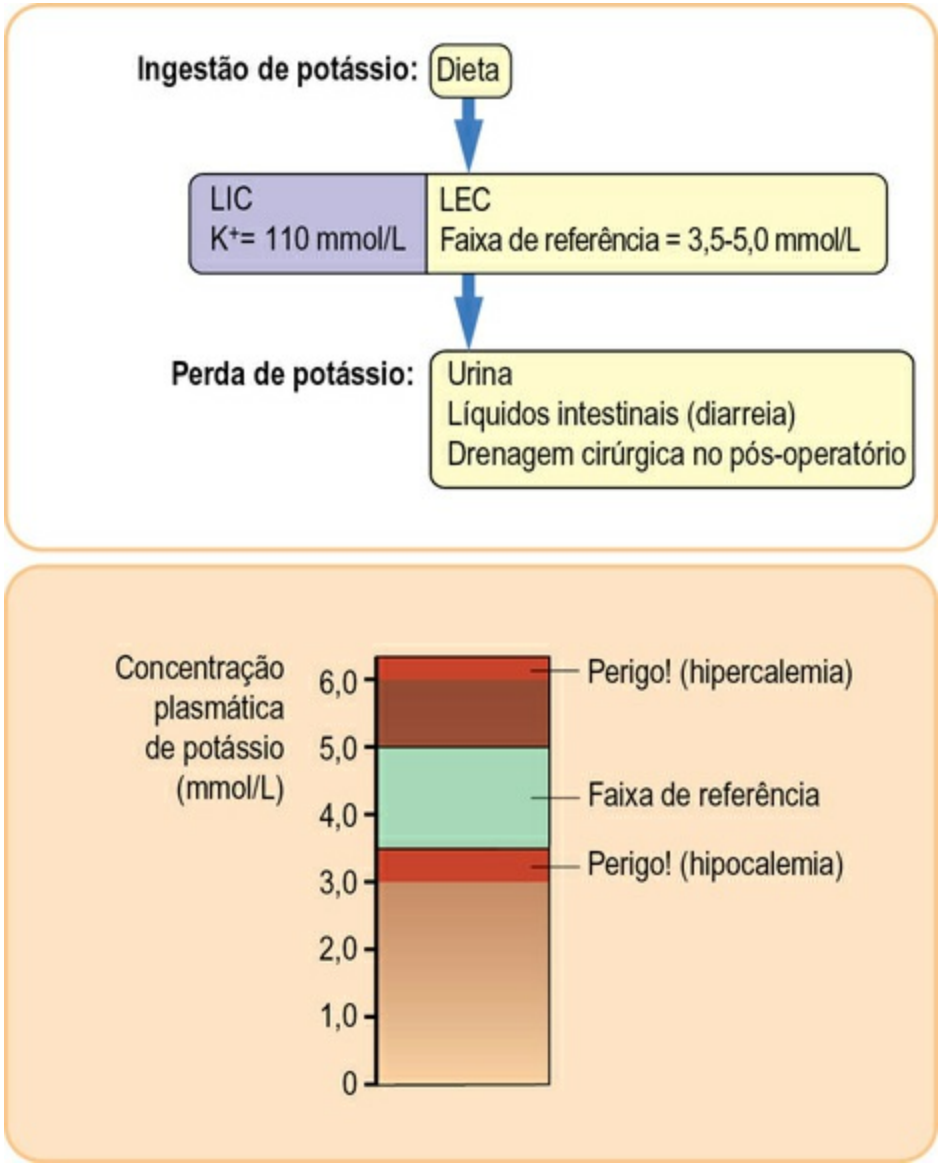


FIG. 24.9 Equilíbrio do potássio.
A concentração sérica do potássio é mantida dentro de limites estreitos. Tanto concentrações baixas (hipocalemia) quanto elevadas (hipercalemia) são perigosas, porque o potássio afeta a contratilidade do músculo cardíaco. Geralmente, concentrações séricas de potássio acima de 6,0 mmol/L e abaixo de 2,5 mmol/L são consideradas emergências. O painel superior mostra as principais vias de perda de potássio.

Sistema renina-angiotensina

O sistema renina-angiotensina controla a pressão sanguínea e o tônus vascular

A renina é uma enzima produzida principalmente no aparelho justaglomerular do rim; é armazenada em grânulos secretores e liberada em resposta a uma redução na pressão de perfusão renal (entrega diminuída de Na^+ na mácula densa) e tônus simpático aumentado. A renina é uma protease que usa o angiotensinogênio circulante como seu substrato. A secreção de renina é regulada por vias envolvendo receptores acoplados a proteínas G e a adenilato ciclase — via PKA, que ativa a proteína ligante do elemento responsivo ao cAMP (CREB). A CREB é um fator de transcrição que recruta subsequentemente seus coativadores e se liga ao elemento responsivo ao cAMP no promotor do gene da renina, iniciando a transcrição. A secreção da renina é também

estimulada pela norepinefrina e pela prostaglandina E_2 (PGE_2).

Outra via de sinalização envolvendo as proteínas G e um aumento do cálcio citosólico diminui a atividade da adenilato ciclase e inibe a secreção da renina (esta via é ativada pela angiotensina II e pelas endotelinas I e II).

O angiotensinogênio é uma glicoproteína com mais de 400 aminoácidos sintetizada no fígado, e seus diferentes derivados apresentam estrutura e massa molecular variáveis. A renina forma um peptídio com 10 aminoácidos, a angiotensina I, pela clivagem do angiotensinogênio. A angiotensina I então se torna um substrato para a peptidil-dipeptidase A (enzima conversora de angiotensina; ECA). A ECA remove dois aminoácidos da angiotensina I, produzindo angiotensina II. Essa reação também pode ser catalisada por enzimas como quimase e catepsina. Outra forma de angiotensina, angiotensina 1-9, é formada pela isoforma da ECA (ECA2) e é subsequentemente degradada a angiotensina 1-7. Esta última também pode ser formada da angiotensina II por endopeptidases. Quantidades substanciais de angiotensina II são formadas no rim. As células justaglomerulares contêm ECA, angiotensina I e angiotensina II. A angiotensina II também é sintetizada nas células glomerulares e tubulares e é secretada no líquido tubular e no espaço intersticial. Os receptores da angiotensina II estão presentes nas células tubulares e células vasculares renais: assim, a angiotensina II produzida localmente talvez influencie a reabsorção tubular e o tônus vascular renal pelas ações autócrina e parácrina. O sistema renina-angiotensina encontra-se ilustrado na Figura 24.10.

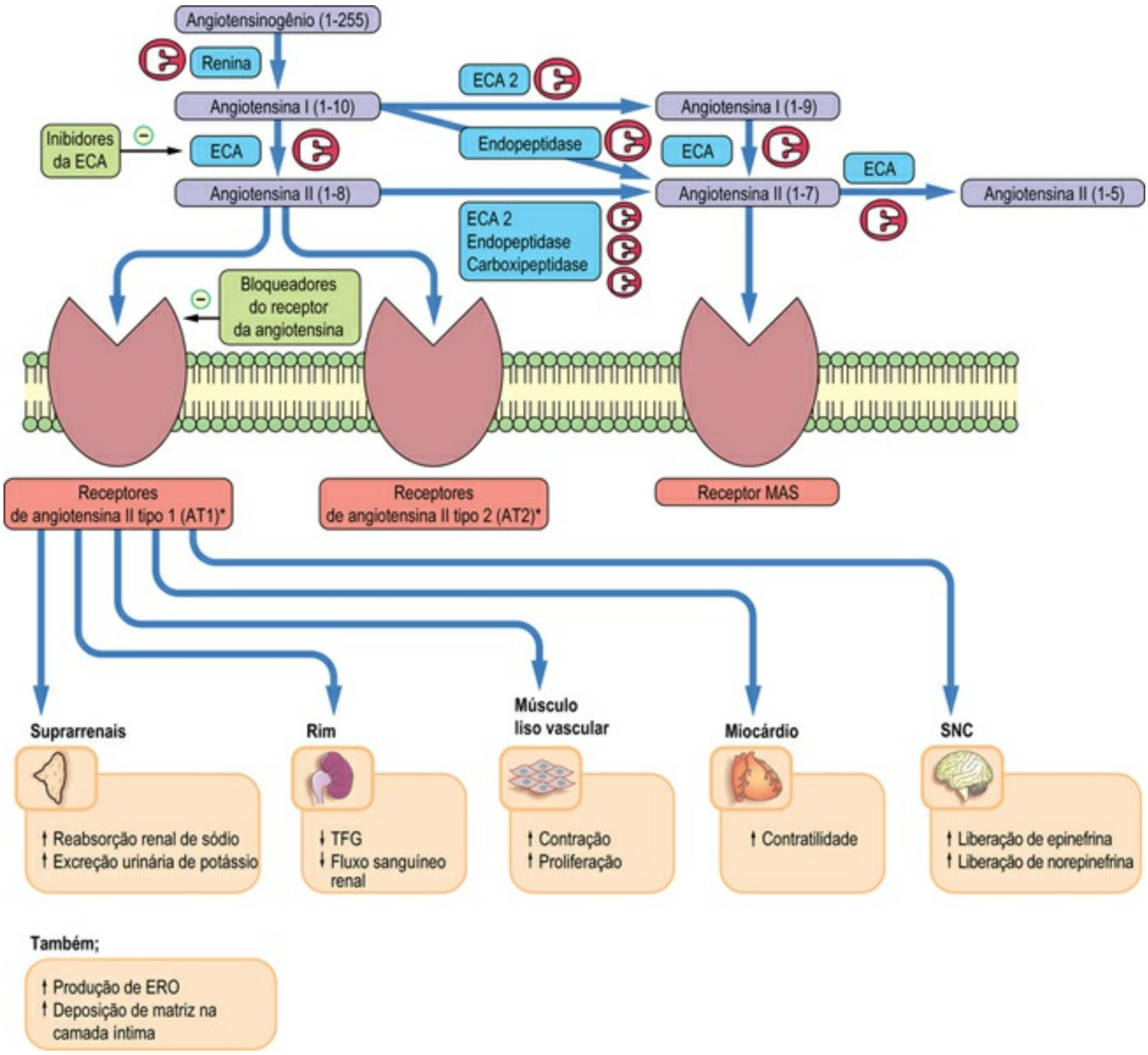


FIG. 24.10 O sistema renina-angiotensina.
A renina converte o angiotensinogênio em angiotensina I. A angiotensina I é posteriormente convertida em angiotensina II pela enzima conversora de angiotensina (ECA). Ela também fornece outros peptídios angiotensina. Ações celulares das angiotensinas são mediadas por receptores tipo 1 (AT1), tipo 2 (AT2) e receptores MAS, que se ligam à angiotensina (1-7). O sistema renina-angiotensina é um alvo para as duas principais classes de fármacos anti-hipertensivas: inibidores da ECA (p. ex., ramipril, enalapril) e antagonistas do receptor AT1 (p. ex., losartan). Os inibidores da ECA são também largamente utilizados no tratamento da insuficiência cardíaca. CMLV, células musculares lisas vasculares; ERO: espécie reativa de oxigênio; SNC, sistema nervoso central. *Receptor AT1 bloqueado pelo losartano. **Receptor AT2 bloqueado pela saralasina.

Os receptores de angiotensina são importantes na patogênese da doença cardiovascular

A angiotensina II induz constrição do músculo liso vascular, consequentemente aumentando a pressão sanguínea e reduzindo o fluxo sanguíneo renal e a taxa de filtração glomerular. Também estimula a liberação de aldosterona e a proliferação das células do músculo liso vascular pela ativação de receptores AT1, os quais sinalizam através de proteínas G e fosfolipase C (Fig. 24.11). Geralmente, a ativação do receptor AT1 tem efeitos que promovem a doença cardiovascular: estimulação da resposta inflamatória, deposição de matriz extracelular, geração de espécies reativas do oxigênio

(ERO) e efeito pró-trombótico. Estas ações são antagonizadas pela ativação dos receptores AT2, que induzem vasodilatação por meio da estimulação da produção de óxido nítrico, promovem perda de sódio e inibem a proliferação das células musculares lisas vasculares. As ações da angiotensina (1-7), a qual age por meio do receptor denominado MAS (ela também pode se ligar a AT1 e AT2), também parecem ser cardioprotetoras. Fármacos que inibem a ECA são muito usados atualmente no tratamento da hipertensão e insuficiência cardíaca (Fig. 24.11 e Quadro da p. 61)

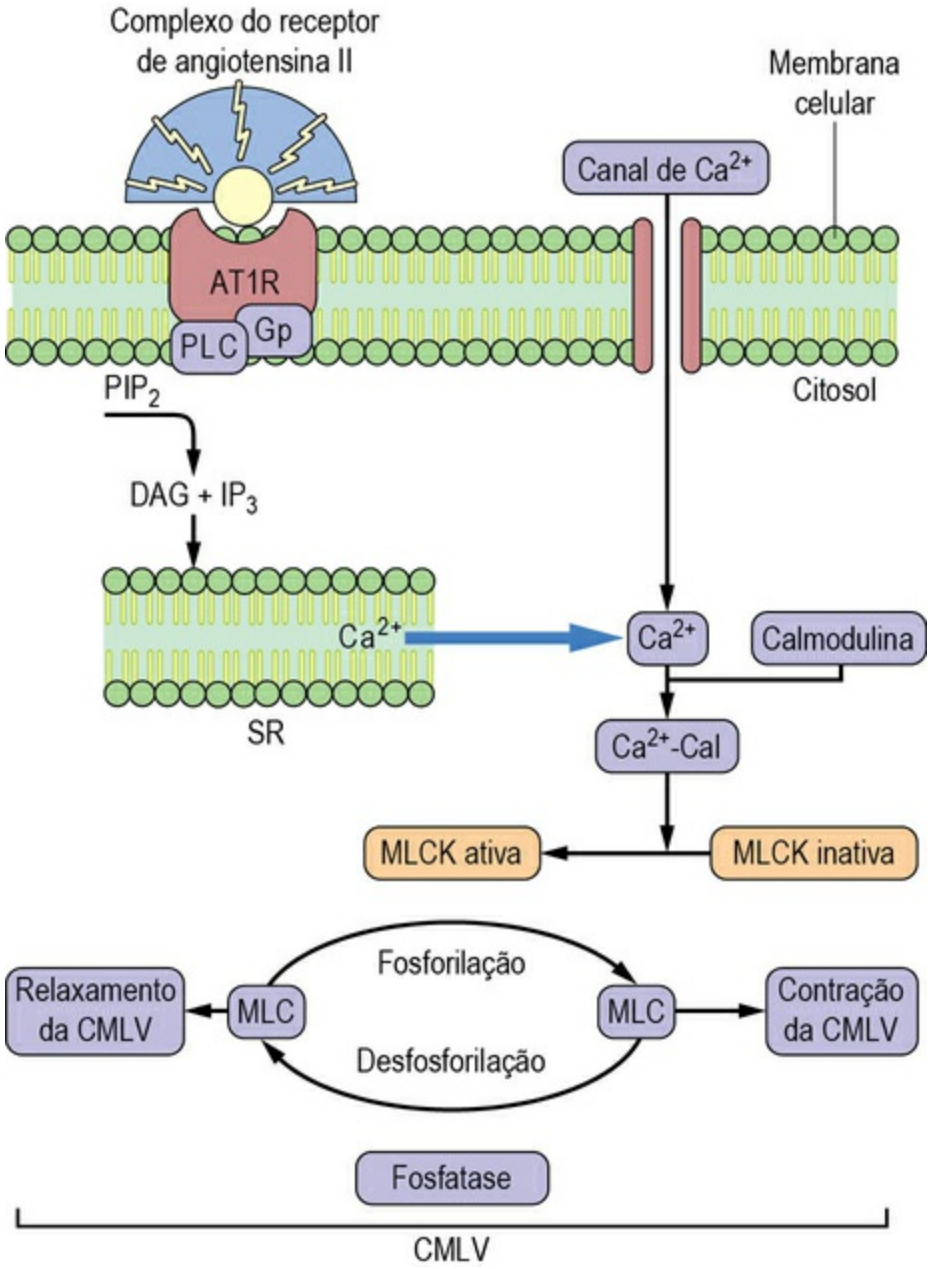


FIG. 24.11 Vasoconstrição induzida pela angiotensina II.
O receptor de angiotensina tipo 1 (AT1R) está acoplado a proteínas G. A ligação de angiotensina II com o receptor leva à formação de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) e 1,2-diacilglicerol (DAG) mediada pela fosfolipase C. Isto mobiliza Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (SR) e estimula a entrada do Ca^{2+} extracelular através da ativação de canais de cálcio. O aumento do Ca^{2+} citosólico inicia a resposta contrátil das células musculares lisas vasculares. O Ca^{2+} subsequentemente se liga à calmodulina (Cal). O complexo Ca^{2+}- calmodulina ativa a cinase de cadeia leve da miosina (MLKC), que fosforila as cadeias leves da miosina e provoca tensão muscular. Este efeito é terminado pela desfosforilação da miosina (Cap. 20). Antagonistas dos receptores AT1, como o losartano, inibem os efeitos vasoconstritores da angiotensina II e são usados no tratamento da hipertensão. AT1R: Receptor de angiotensina tipo 1; DAG, 1,2-diacilglicerol; CMLV: célula muscular lisa vascular, MLCK: cinase de cadeia leve de miosina; Cal: calmodulina.

Quadro clínico

O sistema renina-angiotensina- aldosterona e a insuficiência cardíaca

Um homem de 65 anos, com histórico de infarto agudo do miocárdio, apresentou-se com fadiga crescente, dificuldade de respirar e edema de tornozelos. O exame físico revelou taquicardia leve e aumento da pressão venosa jugular. O ecocardiograma mostrou que a função do ventrículo esquerdo durante a sístole estava prejudicada. As dosagens séricas do paciente revelaram: sódio 140 mmol/L, potássio 3,5 mmol/L, proteínas 34 g/dL (normal 35-45 g/dL), creatinina 80 μmol/L (0,90 mg/dL) e ureia 7,5 mmol/L (45 mg/dL).

Comentário

Este homem se apresenta com sintomas e sinais de insuficiência cardíaca. A função cardíaca prejudicada leva a uma redução do fluxo sanguíneo pelos rins, ativação do sistema renina-angiotensina e estímulo da secreção de aldosterona. A aldosterona causa um aumento na reabsorção renal de sódio e retenção de água, aumentando assim o volume de líquido extracelular e causando edema.



Quadro clínico

A hipertensão arterial é uma doença comum

A hipertensão consiste em um aumento inadequado da pressão sanguínea arterial. É desejável que os níveis das pressões sanguíneas sistólica e diastólica sejam menores que 140 mmHg e 90 mmHg, respectivamente (valores ótimos são ainda menores, abaixo de 120/80 mmHg). Segundo a Organização Mundial da Saúde, cerca de 20% da população do mundo desenvolvido sofre desta condição. A hipertensão arterial pode ser classificada como "essencial" (primária) ou "secundária". A causa da hipertensão essencial ainda não foi identificada, embora se saiba que envolve diversos fatores genéticos e ambientais, incluindo componentes neurais, endócrinos e metabólicos. Uma dieta rica em sódio é um fator reconhecido no desenvolvimento da hipertensão.

A hipertensão está associada a um risco aumentado de derrame e infarto agudo do miocárdio e é responsável por uma em cada oito mortes no mundo inteiro. Uma variedade de fármacos é empregada no tratamento moderno da hipertensão. Entre estas se incluem diuréticos tais como a bendrofluazida, fármacos que bloqueiam os adrenorreceptores, inibidores da enzima conversora da angiotensina e antagonistas dos receptores da angiotensina tipo 1 (Quadro da p. 61 e Quadro da p. 315; o feocromocitoma é descrito na p. 558).

Aldosterona

A aldosterona regula a homeostasia do sódio e do potássio

A aldosterona é o principal hormônio mineralocorticosteroide no homem (Cap. 17) e é produzida no córtex adrenal. Ela regula o volume extracelular e tônus vascular, e controla o transporte renal de sódio e potássio. A aldosterona se liga ao receptor do

mineralocorticoide citosólico nas células epiteliais, principalmente no ducto coletor renal. O receptor se move para o núcleo e se liga a domínios específicos em genes-alvo, alterando a sua expressão.

A aldosterona regula a Na^+/K^+-ATPase tanto pelo mecanismo de curta quanto pelo de longa duração e também regula transportadores como Na^+/H^+ tipo 3 no túbulo proximal, o cotransportador Na^+/Cl^- no túbulo distal e o canal de sódio na célula epitelial do ducto coletor. O resultado final é um aumento na reabsorção de sódio e secreção aumentada de potássio e íon hidrogênio.

O hiperaldosteronismo é um fator comum na hipertensão

O aldosteronismo primário ocorre como resultado de uma atividade adrenal anormal e é raro. Pode resultar de um tumor adrenal isolado, um adenoma **(síndrome de Conn).** O hiperaldosteronismo secundário, mais frequente, é devido a uma secreção aumentada de renina. Os **feocromocitomas** são tumores secretores de catecolaminas que causam hipertensão em cerca de 0,1% dos pacientes hipertensos. É importante diagnosticar corretamente um feocromocitoma porque ele pode ser removido cirurgicamente (Cap. 43 e Quadro da p. 558).

Peptídios natriuréticos

Os peptídios natriuréticos são marcadores importantes da insuficiência cardíaca

Uma família de peptídios conhecida como peptídios natriuréticos está envolvida na regulação do volume de líquidos do corpo. Os dois peptídios principais são o **peptídio natriurético atrial** (ANP) e o **peptídio natriurético cerebral** (BNP). O ANP é sintetizado predominantemente no átrio cardíaco como um peptídio com 126 aminoácidos (pró-ANP). Ele é, então, clivado em um peptídio *N*-terminal menor com 98 aminoácidos e no ANP biologicamente ativo com 28 aminoácidos. O BNP é sintetizado nos ventrículos cardíacos como um pró-peptídio de 108 aminoácidos, e é clivado em um peptídio *N*-terminal com 76 aminoácidos e no peptídio biologicamente ativo BNP com 32 aminoácidos. O BNP 32 e outro peptídio, CNP (com 23 aminoácidos), foram isolados do cérebro porcino, de onde vem esse nome. Todos os peptídios natriuréticos possuem uma estrutura em forma de anel devido à presença de uma ponte dissulfeto.

Os peptídios natriuréticos promovem excreção renal de sódio e redução da pressão sanguínea. O ANP e o BNP são secretados em resposta à distensão atrial e à sobrecarga de volume no ventrículo. Eles se ligam a receptores ligados a proteínas G: os receptores tipo A estão localizados predominantemente nas células endoteliais, e os receptores tipo B, no cérebro. Existe uma reatividade cruzada entre os diferentes receptores natriuréticos em relação a estes peptídios.

A via de sinalização inclui a guanilato ciclase membranar e a guanilato ciclase solúvel, sendo a última estimulada pelo NO. O cGMP gerado atua na proteína cinase C e nas fosfodiesterases 2 e 3, regulando dessa forma a síntese de cAMP.

Quadro de teste clínico

Utilidade diagnóstica dos pró-peptídios do peptídio natriurético cerebral (BNP)

Em vez de dosar as formas ativas dos peptídios natriuréticos no plasma, é mais conveniente determinar os pró-peptídios presentes no plasma em quantidades equimolares às espécies ativas. O pró-BNP (1-76) alcança níveis mais altos do que o BNP 32 na insuficiência cardíaca. De forma semelhante, o pró-ANP (1-98) possui meia-vida mais longa no plasma do que o ANP 1-28 biologicamente ativo, estando presente, portanto, em concentrações mais altas na circulação.

Quadro de teste clínico

ANP e BNP como marcadores de insuficiência cardíaca

É importante notar que os níveis de ANP e de BNP estão aumentados na insuficiência cardíaca e consequentemente suas medidas são usadas como marcadores bioquímicos precoces desta condição. Estas medidas são particularmente úteis para excluir a presença de insuficiência cardíaca nos pacientes que se apresentam com sintomas inespecíficos tais como dificuldade respiratória.

Vasopressina e aquaporinas

A reabsorção de água nos ductos coletores renais é controlada pelo hormônio vasopressina, da pituitária posterior, que controla a atividade dos canais de água na membrana, aquaporinas.

A vasopressina determina o volume final e a concentração da urina

A vasopressina (também conhecida como **hormônio antidiurético,** ADH) controla a reabsorção de água nos ductos coletores renais. A vasopressina é sintetizada nos núcleos supraóticos e paraventricular do hipotálamo e é transportada ao longo dos axônios para a pituitária posterior, onde é armazenada antes de ser processada e liberada. A vasopressina se liga ao seu receptor localizado nas membranas das células tubulares nos ductos coletores (Fig. 24.12). O receptor é acoplado a proteínas G e ativa a PKA) A PKA fosforila a aquaporina 2 (AQP2), o que estimula sua translocação para a membrana celular, aumentando a reabsorção de água no ducto coletor. Por outro lado, a secreção de vasopressina precisa ser inibida para permitir a formação de urina diluída. A impossibilidade de inibição total da vasopressina resulta em incapacidade de diluir a urina em níveis de osmolalidade menores do que a do plasma.

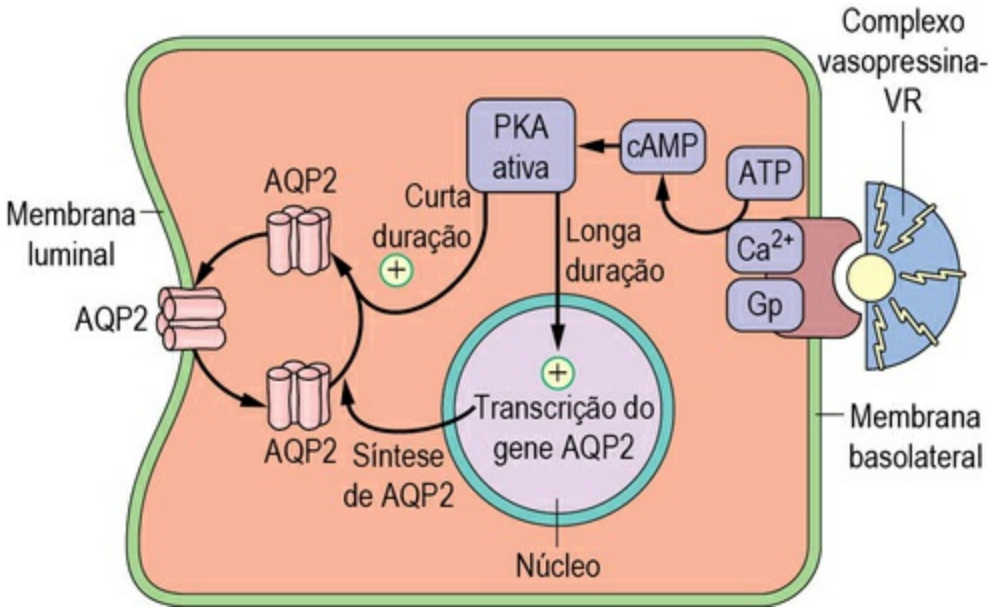


FIG. 24.12 A vasopressina regula a reabsorção de água no ducto coletor.
A vasopressina controla o canal de água aquaporina 2 (AQP2). A vasopressina se liga a seu receptor (VR) e, por meio da ativação de proteínas G (Gp), estimula a produção de cAMP que ativa a proteína cinase A (PKA). A PKA fosforila o AQP2 citoplasmático, e induz sua translocação para a membrana celular, aumentando a capacidade de transporte de água. A vasopressina também regula a expressão do gene AQP2.

Os glicocorticoides estimulam a secreção de vasopressina, sobretudo por meio de seus efeitos hemodinâmicos que diminuem a pressão arterial. Incidentalmente, a vasopressina também é estimulada pela nicotina.

Aquaporinas são proteínas que formam canais na membrana que transportam água

O canal de água aquaporina está ilustrado na Figura 24.13. As AQP2 e 3 estão presentes nos ductos coletores renais e são reguladas pela vasopressina. A AQP1 encontra-se expressa nas membranas apicais e basolaterais dos túbulos proximais e no ramo descendente da alça de Henle e não é regulada pela vasopressina. Encontra-se presente também em eritrócitos, células tubulares renais proximais e no endotélio capilar.

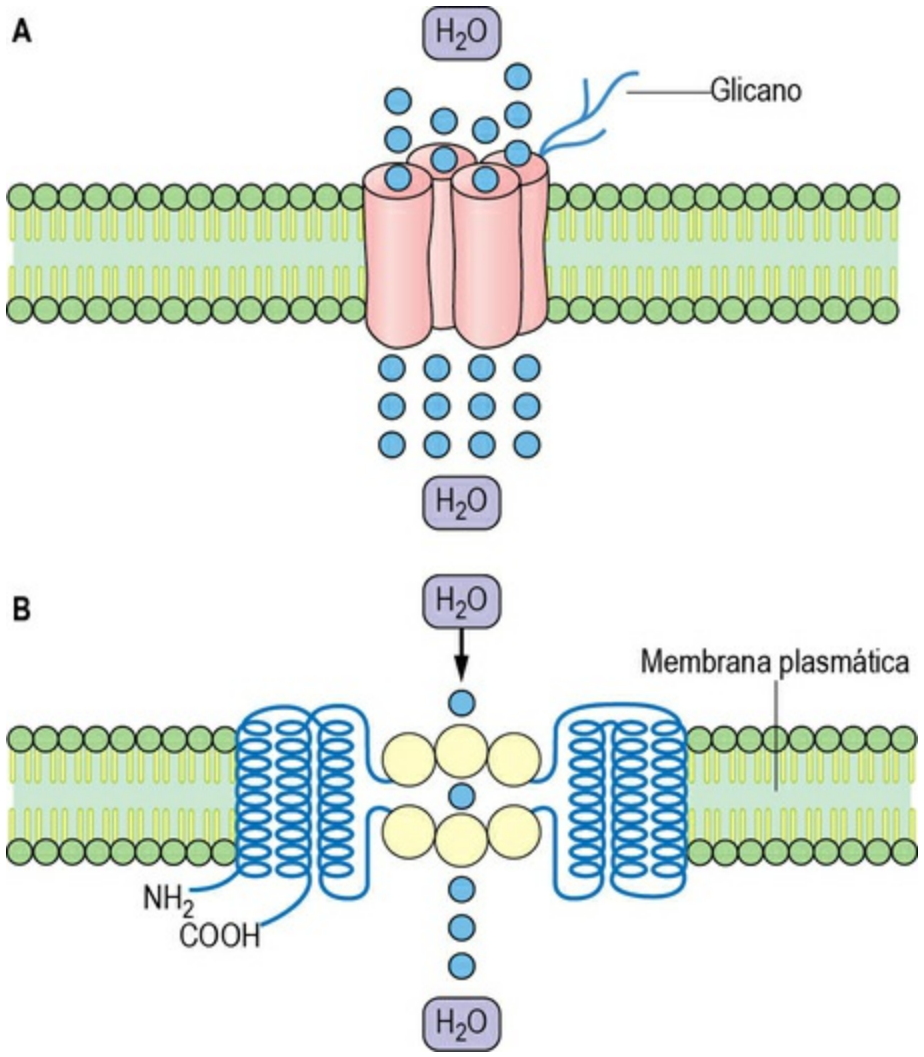


FIG. 24.13 Canal de água aquaporina.
(A) A aquaporina 1 é um canal de água formado por várias subunidades com uma unidade glicana ligada a uma de suas subunidades. **(B)** Cada um dos monômeros apresenta duas estruturas de repetição ao acaso, consistindo em três regiões transmembrana e alças de ligação imersas na membrana.

Defeitos na secreção de vasopressina e mutações nos genes que codificam as aquaporinas causam alterações clínicas

A deficiência de vasopressina causa uma condição conhecida como ***diabetes insípido,*** na qual grande quantidade de urina diluída é excretada. Por sua vez, a secreção excessiva de vasopressina pode ocorrer após um grande trauma ou cirurgia. Esta condição é conhecida como síndrome da **secreção inapropriada de hormônio antidiurético (SIADH),** e leva a retenção de água. Mutações no gene do receptor da vasopressina e também no gene da AQP2 levam a diferentes tipos de **diabetes *insípido nefrogênico,*** uma condição associada à perda de grande quantidade de urina e desidratação.

Integração da homeostase da água e do sódio

Aldosterona e vasopressina juntas controlam o uso da água e do sódio

Normalmente, apesar das variações na ingestão de líquido, a osmolalidade do plasma é mantida dentro de limites estreitos (280-295 mmol/kg H_2O). A vasopressina contribui

para o controle da osmolalidade plasmática regulando o metabolismo da água. Ela responde tanto aos sinais osmóticos como de volume. Por um lado, sua secreção e a sede são estimuladas por sinais dos osmorreceptores que respondem a aumentos bem pequenos (aproximadamente 1%) na osmolalidade plasmática. Por outro lado, a liberação da vasopressina é estimulada por uma redução (acima de 10%) no volume circulante.

Água em excesso aumenta o volume do plasma, do fluxo sanguíneo renal e da TFG

Na condição de excesso de água, a produção de renina é suprimida. A baixa concentração de aldosterona permite a perda de sódio na urina. Como o excesso de água dilui o plasma, a osmolalidade plasmática diminui. A redução na osmolalidade, detectada pelos osmorreceptores hipotalâmicos, suprime a sede e a secreção de vasopressina. A supressão da vasopressina leva a perda de água pela urina. A resposta global ao excesso de água é a perda aumentada de água e sódio na urina.

O déficit de água (desidratação) leva à redução no volume plasmático, no fluxo de sangue renal e na TFG

Quando existe déficit hídrico (desidratação), a redução no fluxo sanguíneo renal estimula o sistema renina-angiotensina-aldosterona. A aldosterona inibe a excreção urinária de sódio. Além disso, o déficit de água provoca um aumento na osmolalidade plasmática e estimula a secreção de vasopressina, com consequente redução no volume urinário. Desta maneira, a resposta geral ao déficit de água é a retenção de sódio e água (Fig. 24.14).

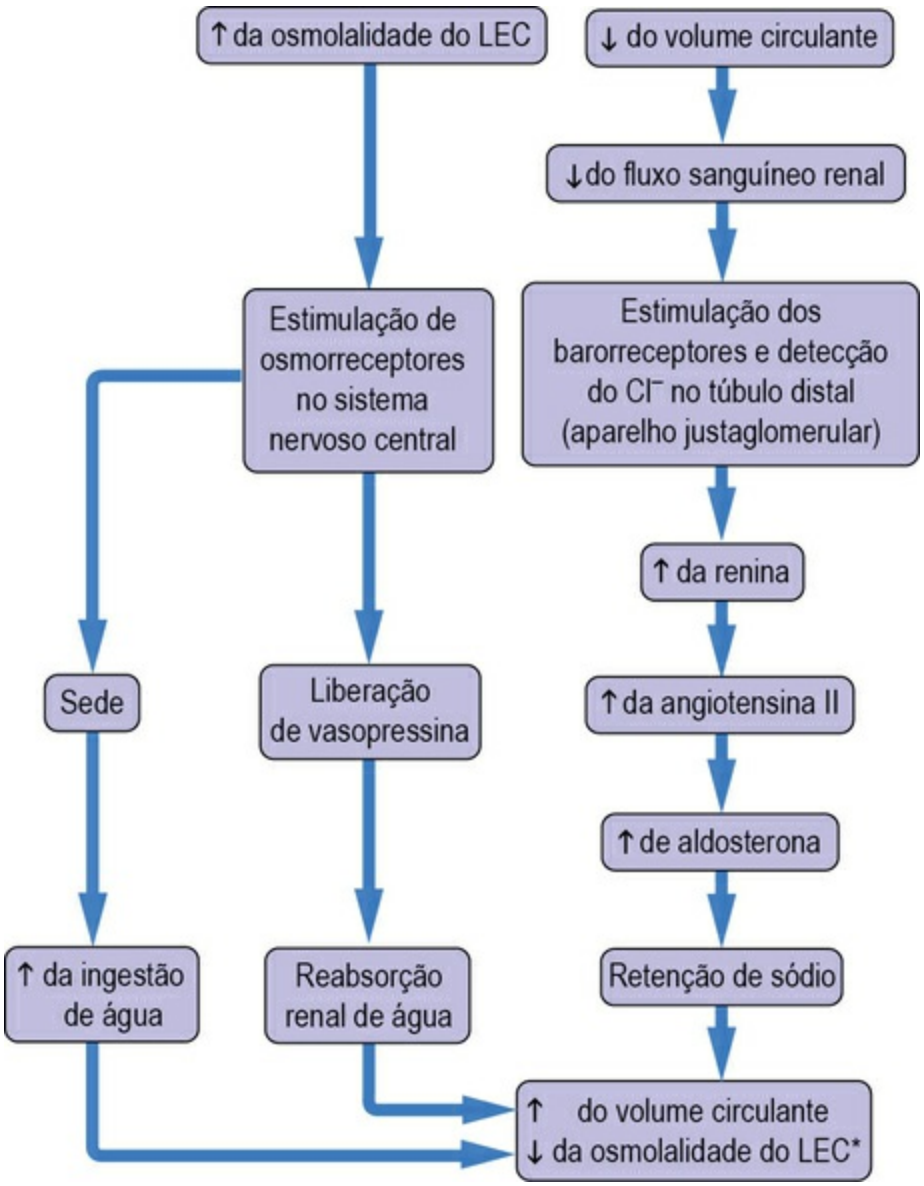


FIG. 24.14 Inter-relação entre o metabolismo da água e do sódio.
Os metabolismos da água e do sódio estão intimamente ligados. **Um aumento na osmolalidade do LEC** estimula a secreção da vasopressina, levando ao aumento da reabsorção renal da água. Isto "dilui" o LEC, e a osmolalidade diminui. Esta resposta é reforçada pelo estímulo da sede. **Um decréscimo no volume plasmático** também estimula a retenção de água por meio da estimulação de receptores sensíveis à pressão (barorreceptores) no aparelho justaglomerular. *A osmolalidade vai diminuir se o grau de retenção de água for relativamente maior do que a retenção de sódio.

Quadro clínico

Ingestão deficiente de líquidos leva à desidratação

Um homem de 80 anos foi admitido no hospital após ter permanecido por período prolongado no chão de sua casa, como resultado de um derrame agudo. Ele apresentou turgor tecidual deficiente, secura na boca, taquicardia e hipotensão. Dosagens no soro revelaram: sódio 150 mmol/L, potássio 5,2 mmol/L, bicarbonato 35 mmol/L, ureia 19 mmol/L (90,3 mg/dL) e creatinina 110 μmol/L (1,13 mg/dL).

Os valores de referência são:

Sódio: 135-145 mmol/L

Potássio: 3,5-5,0 mmol/L
Bicarbonato: 20-25 mmol/L
Ureia: 2,5-6,5 mmol/L (16,2-39 mg/dL)
Creatinina: 20-80 μmol/L (0,28-0,90 mg/dL)

Comentário

Este paciente se apresenta com desidratação, indicada pelos altos valores de sódio e ureia, e a creatinina levemente elevada. Ele foi tratado com fluido intravenoso predominantemente na forma de glicose 5% para repor o déficit de água.

A concentração de sódio no soro é um marcador de desordens do equilíbrio hidroeletrolítico

Os distúrbios hidroeletrolíticos resultam de um desequilíbrio entre a ingestão de líquidos e eletrólitos e sua eliminação, e do movimento da água e eletrólitos entre os compartimentos do organismo. Uma redução na concentração de sódio **(hiponatremia)** geralmente indica que o líquido extracelular está sendo "diluído" (devido a excesso de água), enquanto uma concentração de sódio aumentada (hipernatremia) significa que o líquido extracelular está sendo "concentrado" (devido a perda de água). A hiponatremia também pode resultar da perda de sódio, mas é raro.

A avaliação da condição hídrica e eletrolítica do paciente é uma etapa importante na prática clínica

A avaliação do equilíbrio hidroeletrolítico é uma parte importante do exame clínico. Além do exame físico e da história médica, as seguintes dosagens são necessárias:

- **Concentrações séricas dos eletrólitos:** o perfil solicitado rotineiramente compreende sódio, potássio, cloreto e bicarbonato.
- **Concentrações séricas de creatinina e ureia.**
- **Volume, osmolalidade e concentração de sódio na urina.**
- **Osmolalidade sérica.**
- **Mapa de equilíbrio de fluidos:** os pacientes que possuem ou correm risco de desenvolver alterações hidroeletrolíticas necessitam de acompanhamento diário da ingestão e perda de líquidos.

Resumo

- Tanto o déficit de água no organismo (desidratação) como o excesso (super-hidratação) causam problemas clínicos potencialmente graves. Portanto, a avaliação do equilíbrio hidroeletrolítico é uma parte importante do exame clínico.
- O equilíbrio da água corporal está intimamente ligado com o equilíbrio dos íons dissolvidos (eletrólitos), dentre os quais os mais importantes são o sódio e o potássio.
- O movimento da água entre o LEC e o LIC é controlado pelo gradiente osmótico.
- O movimento da água entre a luz de um vaso sanguíneo e o líquido intersticial é controlado pelo equilíbrio entre as pressões osmótica e hidrostática.

- Os principais reguladores do equilíbrio hidroeletrolítico são a vasopressina (água) e a aldosterona (sódio e potássio).
- O sistema renina-angiotensina é o principal regulador da pressão sanguínea e do tônus vascular.
- A dosagem dos peptídios natriuréticos ajuda no diagnóstico da insuficiência cardíaca.

Questões para aprendizagem

1. Comente o papel da bomba de Na^+/K^+-ATPase na manutenção dos gradientes iônicos através da membrana celular.
2. Explique o papel do sistema renina-angiotensina na manutenção da pressão do sangue.
3. Descreva o movimento da água entre o LEC e o LIC que ocorre na privação de água.
4. Por que uma baixa concentração de albumina no plasma leva ao edema?

Leituras sugeridas

Androgue, H. J., Madias, N. E. Mechanisms of disease: sodium and potassium in the pathogenesis of hypertension. *N Engl J Med*. 2007; 356:1966–1978.

Bekheirnia, R., Schrier, R. W. Pathophysiology of water and sodium retention: edematous states with normal kidney function. *Curr Opin Pharmacol*. 2006; 6:202–207.

Chobanian, A., Bakris, G. L., Black, H. R., et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure. *JAMA*. 2003; 289:2560–2572.

Ellison, D. H., Berl, T. The syndrome of inappropriate antidiuresis. *N Engl J Med*. 2007; 356:2064–2072.

Ernst, M. E., Moser, M. Use of diuretics in patients with hypertension. *N Engl J Med*. 2009; 361:2153–2164.

Goetze, J. P. B-type natriuretic peptide: from posttranslational processing to clinical measurement. *Clin Chem*. 2012; 58:83–91.

Richards, A. M., Troughton, R. W. Use of natriuretic peptides to guide and monitor heart failure therapy. *Clin Chem*. 2012; 58:62–71.

Schrier, R. W. Body water homeostasis: clinical disorders of urinary dilution and concentration. *J Am Soc Nephrol*. 2006; 17:1820–1832.

Verkman, A. S. Aquaporins in clinical medicine. *Ann Rev Med*. 2012; 63:303–316.

Sites

Biesalski HK, Bischoff SC, Boehles HJ, et al: Water, electrolytes, vitamins and trace elements – Guidelines on Parenteral Nutrition, Ger Med Sci Ger Med Sci 72009; Doc21. doi: 10.3205/000080. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2795367/

Medline Plus: Water and electrolyte balance: www.nlm.nih.gov/medlineplus/fluidandelectrolytebalance.html

Powell-Tuck J, Peter Gosling P, Dileep N, et al: British Consensus Guidelines on Intravenous Fluid Therapy for Adult Surgical Patients 2011. www.bapen.org.uk/pdfs/bapen_pubs/giftasup.pdf

CAPÍTULO 25

Regulação da Concentração do Íon Hidrogênio (equilíbrio acidobásico)

Marek H. Dominiczak and Mirosława Szczepaska-Konkel

Objetivos

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Explicar a origem do tampão bicarbonato.
- Descrever a troca gasosa que ocorre nos pulmões.
- Descrever os componentes respiratório e metabólico do equilíbrio acidobásico.
- Definir e classificar acidose e alcalose.
- Comentar sobre as condições clínicas associadas aos distúrbios do equilíbrio acidobásico.

Introdução

Os ácidos são produzidos no decurso do metabolismo

O metabolismo gera dióxido de carbono no interior das células. O dióxido de carbono se dissolve na água, formando ácido carbônico que, por sua vez, se dissocia libertando o íon hidrogênio. Os ácidos derivados de outras fontes que não o CO_2 são conhecidos como não voláteis; por definição, estes não podem ser removidos pelos pulmões e devem ser excretados por via renal. A produção total de ácidos não voláteis é de aproximadamente 50 mmol/24 h.

O ácido lático é produzido durante a glicólise anaeróbica e sua concentração no plasma é a marca característica da hipoxia. Os cetoácidos (ácidos acetoacético e β-hidroxibutírico) são importantes no diabetes (Cap. 21). O metabolismo de aminoácidos que contêm enxofre e de compostos que contêm fósforo também gera ácidos inorgânicos.

Apesar da quantidade de íons hidrogênio produzida, sua concentração sanguínea (ou

seu logaritmo negativo, o pH) é notavelmente constante: mantém-se entre 35 e 45 nmol/L (pH 7,35-7,45). A manutenção de um pH estável é essencial, uma vez que afeta a ionização das proteínas (Cap. 2) e, consequentemente, a atividade de várias enzimas e outras moléculas biologicamente ativas, como os canais iônicos. Alterações no pH juntamente com a pressão parcial de dióxido de carbono (pCO_2) afetam a forma da curva de saturação da hemoglobina e, portanto, a oxigenação dos tecidos (Cap. 5). Adicionalmente, uma diminuição no pH aumenta o tônus simpático e pode levar a disritmias cardíacas.

A manutenção do equilíbrio acidobásico envolve os pulmões, os eritrócitos e os rins

O equilíbrio acidobásico envolve os pulmões, os eritrócitos e os rins (Fig. 25.1). Os pulmões controlam as trocas de dióxido de carbono e oxigênio entre o sangue e a atmosfera; os eritrócitos transportam gases entre os pulmões e os tecidos; e os rins controlam a síntese de bicarbonato plasmático e a excreção do íon hidrogênio.

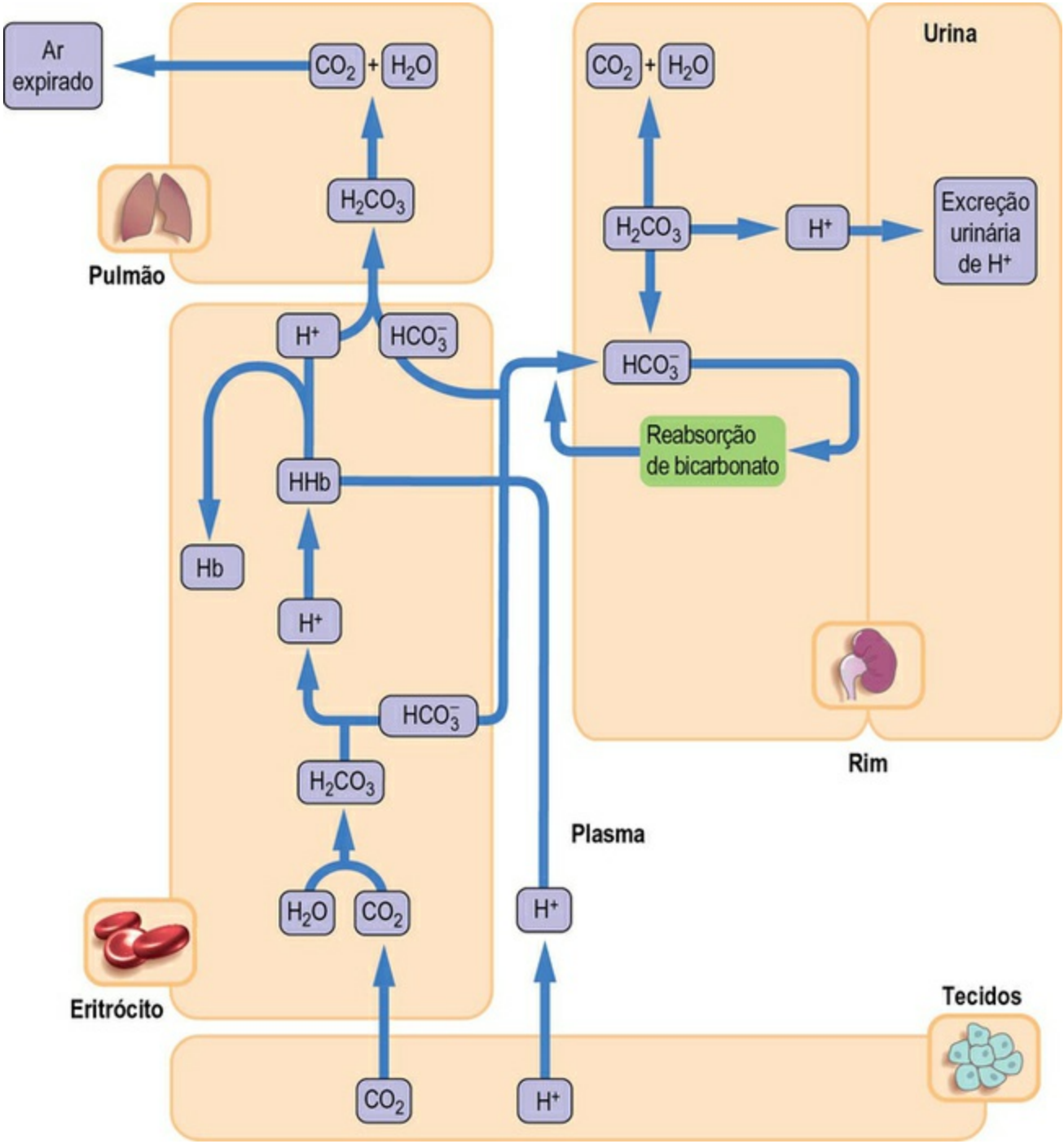


FIG. 25.1 O equilíbrio acidobásico.
Os pulmões, os rins e os eritrócitos contribuem para a manutenção do equilíbrio acidobásico. Os pulmões controlam as trocas gasosas com o ar atmosférico. O dióxido de carbono gerado nos tecidos é transportado no plasma como bicarbonato; a hemoglobina dos eritrócitos contribui para o transporte de CO_2. A hemoglobina também faz o tamponamento do íon hidrogênio derivado do ácido carbônico. Os rins reabsorvem o bicarbonato filtrado nos túbulos proximais e produzem bicarbonato de novo nos túbulos distais, onde existe uma secreção efetiva de íon hidrogênio. Hb, hemoglobina.

Relevância clínica

Clinicamente, a compreensão do equilíbrio acidobásico é importante em várias subespecialidades da medicina e da cirurgia e, particularmente, na anestesiologia e na medicina intensiva.

Os sistemas-tampão corporais: os componentes respiratório e metabólico do equilíbrio acidobásico

O sangue e os tecidos contêm sistemas-tampão que minimizam as alterações na concentração do íon hidrogênio

O principal tampão que neutraliza os íons hidrogênio liberados pelas células é o **tampão bicarbonato.** Outro tampão importante é a **hemoglobina,** que contribui para o tamponamento do íon hidrogênio gerado pela reação da anidrase carbônica. No interior das células, o íon hidrogênio é neutralizado por tampões intracelulares, principalmente as **proteínas** e os **fosfatos** (Tabela 25.1 e Cap. 2).

Tabela 25.1

Os principais sistemas-tampão do organismo

Tampão	Ácido	Base conjugada	Local principal de ação do tampão
Hemoglobina	HHb	Hb^-	Eritrócitos
Proteínas	HProt	$Prot^-$	Fluido intracelular
Tampão fosfato	$H_2PO_4^-$	HPO_4^{2-}	Fluido intracelular
Bicarbonato	$CO_2 \rightarrow H_2CO_3$	HCO_3^-	Fluido extracelular

Ver Capítulo 2 relativamente aos princípios da ação dos tampões. De acordo com a definição de Brønsted-Lowry, um ácido é "uma espécie molecular que tem tendência para ceder um íon hidrogênio, formando uma base conjugada".

O tampão bicarbonato é um sistema aberto que permanece em equilíbrio com o ar atmosférico

A capacidade de tamponamento do tampão bicarbonato excede a de todos os sistemas-tampão "fechados". O CO_2 produzido metabolicamente se difunde através das membranas celulares e se dissolve no plasma. O coeficiente de solubilidade plasmática do CO_2 é de 0,23 se o pCO_2 for medido em kPa (0,03 se o pCO_2 for medido em mmHg; 1 kPa = 7,5 mmHg ou 1 mmHg = 0,133 kPa). Assim, na presença de uma pCO_2 normal de 5,3 kPa (40 mmHg), a concentração de CO_2 dissolvido (dCO_2) é:

$$dCO_2\,(\text{mmol/L}) = 5,3\ \text{kPa} \times 0,23 = 1,2\ \text{mmol/L}$$

O CO_2 se equilibra com o H_2CO_3 no plasma através de uma reação não enzimática lenta. Normalmente, a concentração plasmática de H_2CO_3 é muito baixa, cerca de 0,0017 mmol/L. No entanto, devido ao equilíbrio entre o H_2CO_3 e o CO_2 dissolvido (teoricamente todo o CO_2 dissolvido pode, por ventura, converter-se em H_2CO_3), este

componente do tampão bicarbonato pode ser considerado como igual à soma do H_2CO_3 e do CO_2 dissolvido. A equação-chave para descrever o comportamento do tampão bicarbonato é a **equação de Henderson-Hasselbalch** (Cap. 2). Esta equação expressa a relação entre o pH e os componentes do tampão:

$$\mathrm{pH} = \mathrm{p}K + \log([\text{bicarbonato}] / \mathrm{pCO_2} \times 0,23)$$

A equação demonstra que o pH sanguíneo é determinado pela razão entre a concentração de bicarbonato plasmático (o **componente "básico"** do tampão) e a concentração de CO_2 dissolvido (o **componente "ácido"**). Normalmente, em presença de uma pCO_2 de 5,3 kPa e de uma concentração de dCO_2 de 1,2 mmol/L (ver acima) a concentração plasmática de bicarbonato é de cerca de 24 mmol/L. A p*K* do tampão bicarbonato é de 6,1. Inserindo as concentrações dos componentes do tampão na equação anterior temos:

$$\mathrm{pH} = 6,1 + \log(24 / 1,2) = 7,40$$

Assim, a concentração de bicarbonato e a pressão parcial de CO_2 normais correspondem a um pH de 7,40 (concentração do íon hidrogênio de 40 nmol/L). O tampão bicarbonato minimiza as alterações na concentração do íon hidrogênio quando um ácido é adicionado ao sangue.

Quando a concentração de H^+ no sistema aumenta, o componente bicarbonato do tampão aceita (H^+), formando ácido carbônico, que é subsequentemente convertido em CO_2 e H_2O na reação catalisada pela **anidrase carbônica:**

$$H^+ + HCO_3^- \rightleftharpoons H_2CO_3 \rightleftharpoons CO_2 + H_2O$$

O CO_2 é eliminado através dos pulmões. O excesso de íons hidrogênio é neutralizado, e a razão [bicarbonato]/pCO_2, trazida de volta para a normalidade.

Por outro lado, quando a concentração de H^+ diminui, o componente ácido carbônico do tampão se dissocia para fornecer H^+ para uma reação que forma água e o íon bicarbonato (nesta fase o aumento do bicarbonato plasmático é mínimo):

$$H_2CO_3 \rightarrow H^+ + HCO_3 -$$

Subsequentemente, a taxa de ventilação diminui, retendo CO_2 e tentando normalizar a razão [bicarbonato]/pCO_2:

$$CO_2 + H_2O \rightarrow H_2CO_3$$

Assim, o denominador na equação de Henderson-Hasselbalch (pCO_2) é controlado pelos pulmões. Por essa razão é chamado **"componente respiratório do equilíbrio acidobásico"**. Por outro lado, a concentração plasmática de bicarbonato é controlada pelos rins e pelos eritrócitos, e, consequentemente, isto é chamado **"componente metabólico do equilíbrio acidobásico"** (Fig. 25.2).

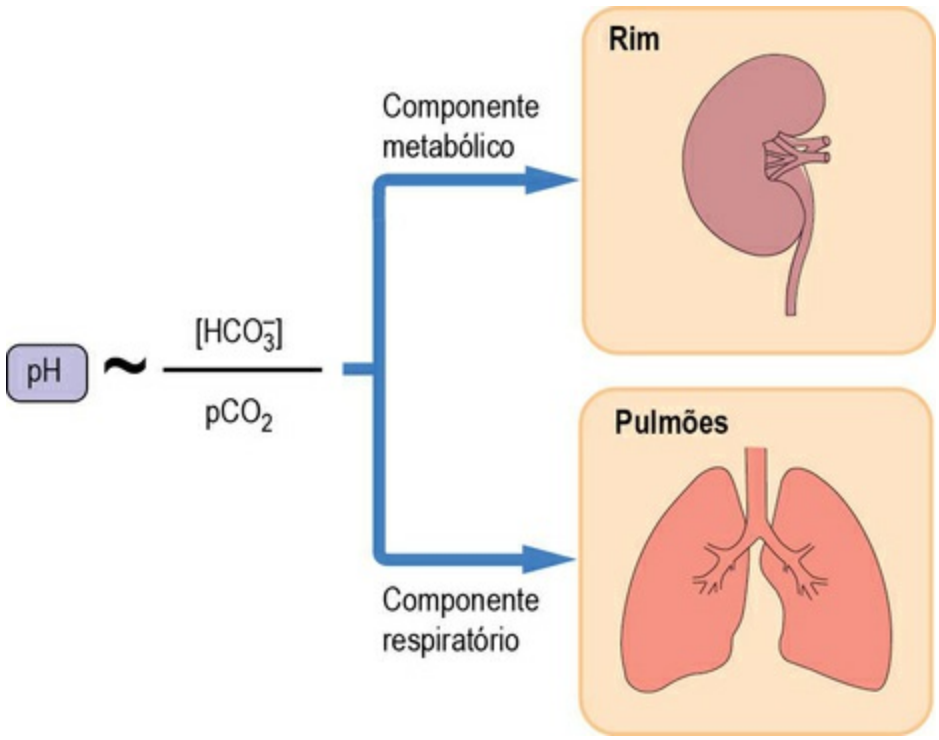


FIG. 25.2 O tampão bicarbonato.
O pH sanguíneo é proporcional à razão entre o bicarbonato plasmático e a pressão parcial de dióxido de carbono (pCO_2). Os componentes do tampão bicarbonato são o dióxido de carbono e o bicarbonato. A pCO_2 é o componente respiratório do equilíbrio acidobásico e o bicarbonato é o componente metabólico.

A anidrase carbônica converte o CO_2 dissolvido em ácido carbônico

Os eritrócitos e as células tubulares renais possuem uma enzima que contém zinco, a anidrase carbônica (CA), que converte CO_2 dissolvido em ácido carbônico. Este se dissocia, produzindo íons hidrogênio e bicarbonato:

$$CO_2 + H_2O \overset{CA}{\rightleftarrows} H_2CO_3 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3 -$$

É dessa forma que as células tubulares renais e os eritrócitos produzem bicarbonato. Os rins regulam a reabsorção e síntese de bicarbonato e os eritrócitos ajustam sua concentração em resposta a alterações na pCO_2.

Os componentes respiratório e metabólico do equilíbrio acidobásico estão interligados

Os componentes respiratório e metabólico do equilíbrio ácido- base estão intimamente ligados: um tenta compensar as alterações prejudiciais do outro. Quando o distúrbio primário é respiratório (como, por exemplo, uma doença pulmonar obstrutiva crônica, DPOC, grave) e causa acumulação de CO_2, ocorre um aumento compensatório na reabsorção de bicarbonato pelo rim. Inversamente, a diminuição da pCO_2 (como ocorre durante a hiperventilação em uma crise de asma) causará uma resposta renal, levando à diminuição da reabsorção de bicarbonato.

De forma recíproca, quando o problema primário é metabólico (por exemplo, cetoacidose diabética), a diminuição da concentração de bicarbonato e a consequente diminuição do pH estimulam o centro respiratório a aumentar a frequência ventilatória. O CO_2 é expirado e a pCO_2 diminui. É por isso que pacientes com acidose metabólica hiperventilam. Por outro lado, o aumento do bicarbonato plasmático (causando um aumento do pH) leva à diminuição da frequência ventilatória e à retenção de CO_2. Assim, a alteração compensatória tende sempre a normalizar a razão [bicarbonato]/pCO_2, ajudando a trazer o pH de volta ao normal (Fig. 25.3).

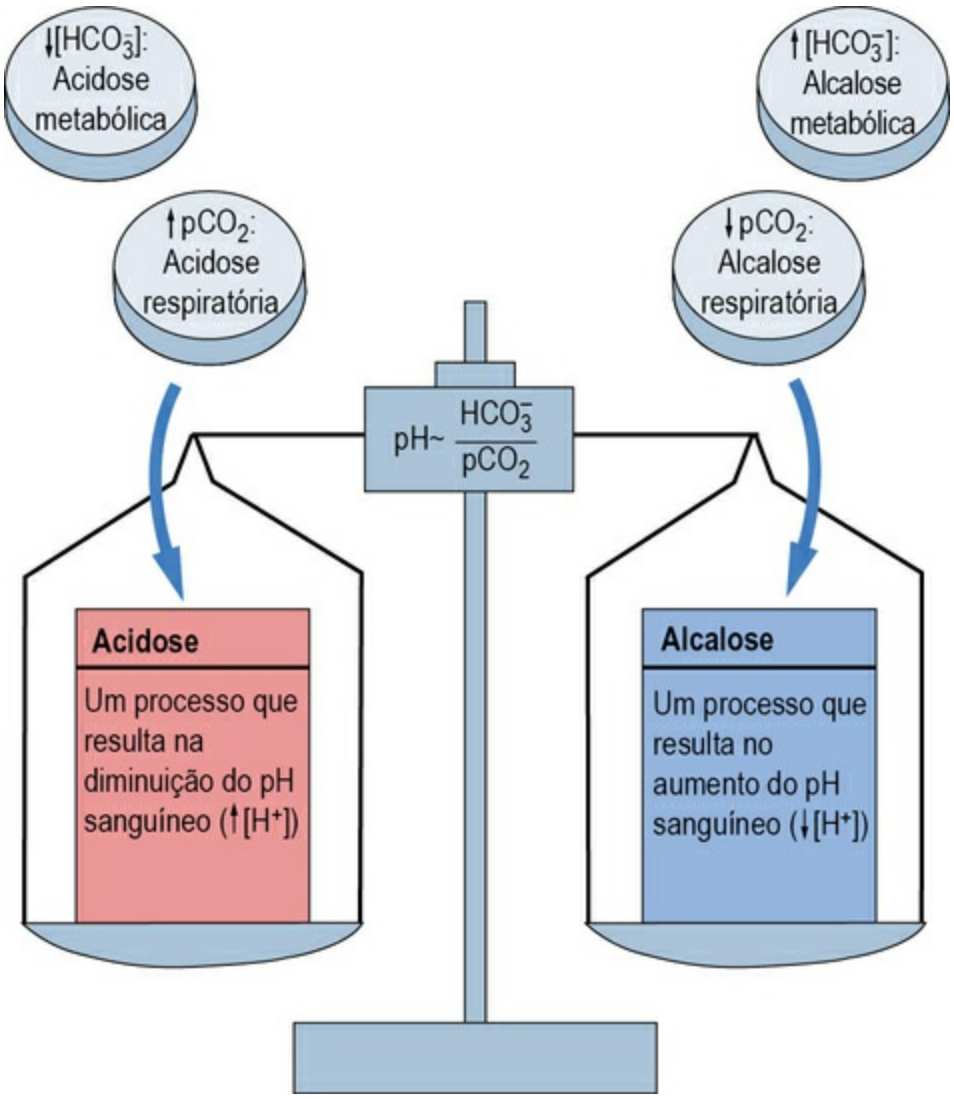


FIG. 25.3 Distúrbios do equilíbrio acidobásico.
O aumento primário da pCO_2 ou a diminuição da concentração plasmática de bicarbonato levam a acidose. A diminuição da pCO_2 ou o aumento do bicarbonato plasmático levam a alcalose. Se a alteração primária é na pCO_2, o distúrbio é chamado respiratório, e se a alteração primária é no bicarbonato plasmático, é chamado metabólico.

Tamponamento intracelular

Os tampões intracelulares são as proteínas e os fosfatos

Os dois principais tampões intracelulares são as proteínas e os fosfatos, e o tamponamento é conduzido pelas razões $HPO_4^{2-}/H_2PO_4^-$ e [proteína]/proteína-H. A hemoglobina é uma importante proteína de tampão extracelular.

Note que quando o íon hidrogênio está presente em excesso no plasma, entra nas células por troca com o potássio, o que pode resultar em um aumento da concentração plasmática deste íon. Inversamente, a diminuição da concentração plasmática do íon hidrogênio, ou o excesso de bicarbonato, é tamponado pelo íon hidrogênio derivado das células. O íon hidrogênio entra no plasma por troca com o potássio, diminuindo a concentração plasmática deste íon. Assim, a acidemia (pH sanguíneo baixo) pode estar associada a hipercalemia, e a alcalemia (pH sanguíneo alto) pode estar associada a

hipocalemia (Fig. 25.4).

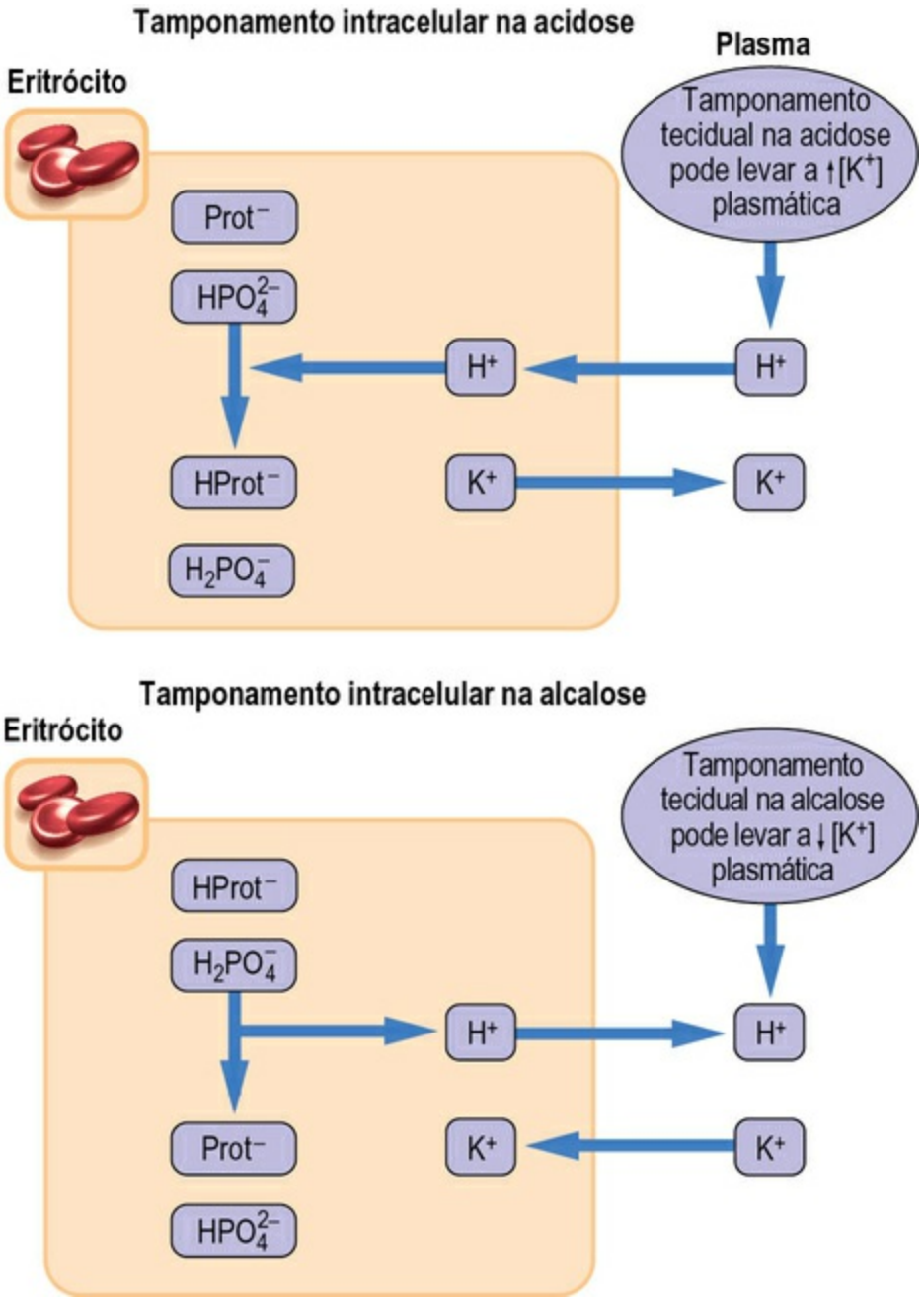


FIG. 25.4 Tampões intracelulares: proteínas, fosfatos e a troca iônica potássio-hidrogênio. Os tampões intracelulares são constituídos primariamente pelas proteínas e pelos fosfatos. No entanto, o íon hidrogênio entra nas células por troca com o potássio. Dessa forma, uma acumulação de íons hidrogênio no plasma (acidemia), com consequente entrada dos íons hidrogênio em excesso para as células, aumenta a concentração plasmática de potássio. Inversamente, uma diminuição de íons hidrogênio no plasma (alcalemia) pode levar a uma concentração plasmática de potássio baixa. Prot, proteína.

A determinação dos gases no sangue

A "determinação dos gases no sangue" é um importante exame laboratorial de primeira linha. Na insuficiência respiratória é também essencial para guiar a oxigenoterapia e a ventilação assistida.

A determinação é feita em uma amostra de sangue arterial, colhida habitualmente da

artéria radial no antebraço. O termo "gasimetria" utilizado na gíria corresponde à medição da **pO_2, pCO_2 e do pH** (ou concentração do íon hidrogênio) a partir das quais é calculada a concentração de **bicarbonato** usando a equação de Henderson-Hasselbalch. Vários outros indicadores são calculados: nestes estão incluídos a quantidade total de tampões no sangue (a **base tampão**) e a diferença entre a quantidade desejada (normal) de tampões no sangue e sua quantidade real **(excesso de base).** Os valores de referência para pH, pCO_2 e O_2 são dados na Tabela 25.2.

Tabela 25.2

Intervalos de referência para os resultados da gasimetria

A. Intervalos de referência*

	Arterial	Venoso
$[H^+]$	35-45 mmol/L	
pH	7,35-7,45	
pCO_2	4,6-6,0 kPa (35-45 mmHg)	4,8-6,7 kPa (36-50 mmHg)
pO_2	10,5-13,5 kPa (79-101 mmHg)	4,0-6,7 kPa (30-50 mmHg)
Bicarbonato	23-30 mmol/L	22-29 mmol/L

B. Comparação entre as unidades convencional e do SI da concentração do íon hidrogênio

Unidade convencional: pH	Unidade SI: $[H^+]$ nmol/L
6,8	160
7,1	80
7,4	40
7,7	20

*Os valores medidos na "gasimetria" são pH, pCO_2 e pO_2; a concentração de bicarbonato é calculada a partir dos valores de pH e pCO_2; pH abaixo de 7,0 ou acima de 7,7 é potencialmente fatal.

(Adaptado com permissão de Hutchinson AS. In Dominiczak MH, editor. Seminars in clinical biochemistry, Glasgow, 1997, Glasgow University Press.)

Pulmões: a troca gasosa

Os pulmões fornecem o oxigênio necessário para o metabolismo dos tecidos e removem o CO_2 formado

Aproximadamente 10.000 litros de ar passam através dos pulmões de uma pessoa de estatura média por dia. Os pulmões se situam na cavidade torácica, rodeados pelo saco

pleural, uma "bolsa" fina de tecido que reveste a cavidade torácica em um dos lados e se fixa à superfície exterior dos pulmões no outro. Quando a cavidade torácica se expande durante a inspiração, a pressão negativa criada no saco pleural em expansão insufla o pulmão.

As vias aéreas são "tubos" de diâmetro progressivamente menor. As vias aéreas consistem na traqueia, nos grandes e pequenos brônquios e nos ainda menores bronquíolos (Fig. 25.5). No final dos bronquíolos existem os alvéolos pulmonares — estruturas revestidas por endotélio e cobertas por uma película de surfactante — cujo principal componente é a dipalmitoilfosfatidilcolina (Cap. 26). O surfactante diminui a tensão de superfície do alvéolo. As trocas gasosas ocorrem nos alvéolos.

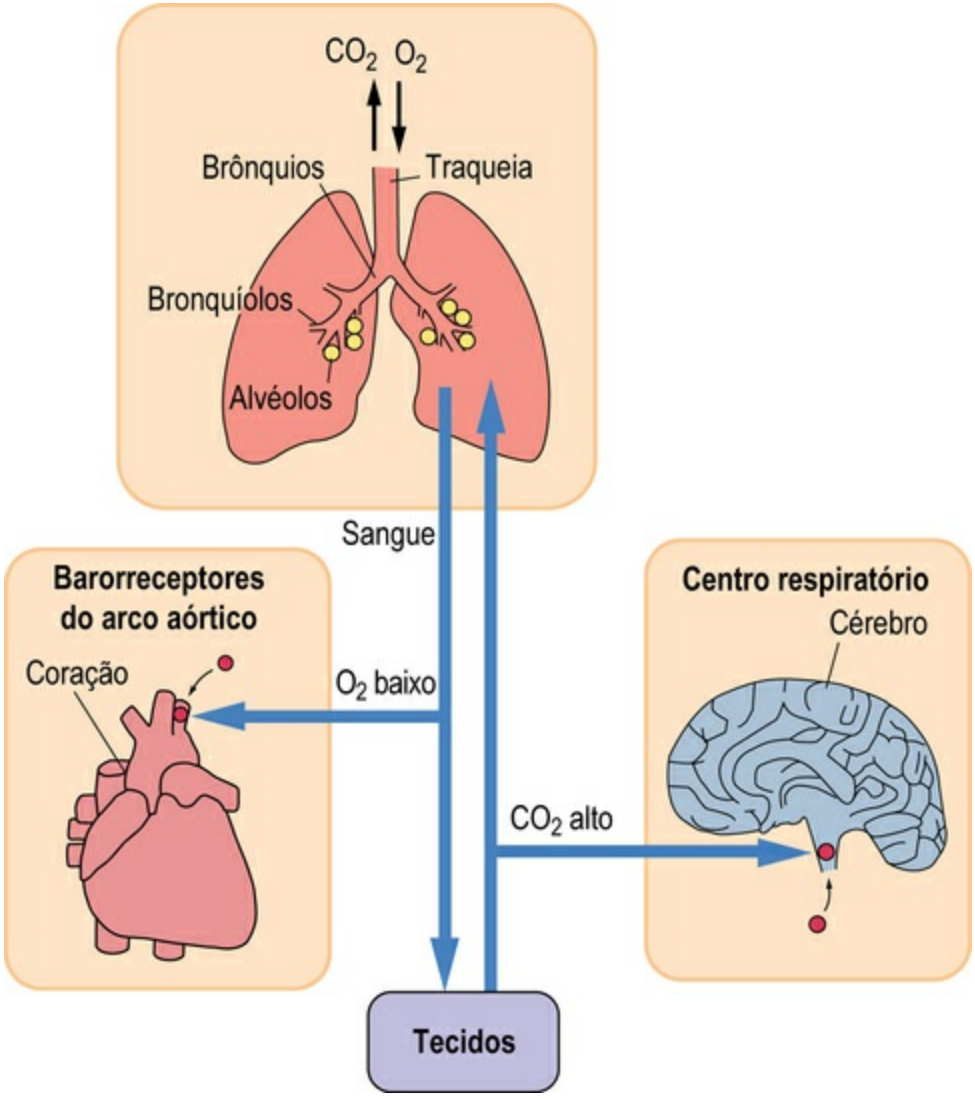


FIG. 25.5 Controle da taxa respiratória pela pCO_2 e pO_2.
A ventilação e a perfusão pulmonares são fatores principais no controle das trocas gasosas. A pCO_2 regula a taxa ventilatória através dos quimioreceptores centrais no tronco cerebral. Quando a pO_2 diminui, este controle altera-se para os receptores periféricos sensíveis à pO_2, nos corpos carotídeos e no arco aórtico.

A frequência respiratória é controlada pelo centro respiratório localizado no tronco cerebral

Tanto a pressão parcial de oxigênio (pO_2) quanto a de dióxido de carbono (pCO_2) afetam a frequência ventilatória: o centro respiratório possui quimioreceptores sensíveis à pCO_2 e ao pH. Em circunstâncias normais não é a pO_2 que estimula a ventilação, mas sim o aumento da pCO_2 ou a diminuição do pH. No entanto, quando a pO_2 diminui e se desenvolve hipoxia, esta vai começar a controlar a ventilação através de um conjunto de receptores localizados nos corpos carotídeos no arco aórtico. Quando a pO_2 arterial é inferior a 8 kPa (60 mmHg), esse **"estímulo hipóxico"** torna-se o principal determinante da frequência ventilatória. Pacientes que sofrem de hipoxia devido a doenças pulmonares crônicas dependem do estímulo hipóxico para manter sua frequência ventilatória (ver Quadro Clínico nesta página).



Quadro clínico

A acidose respiratória ocorre na doença pulmonar crônica

Uma mulher de 56 anos foi admitida em uma enfermaria com dispneia progressiva. Fumava 20 cigarros por dia ao longo dos últimos 25 anos e relatava crises frequentes de "bronquite do inverno". A gasimetria revelou pO_2 de 6 kPa (45 mmHg), pCO_2 de 8,4 kPa (53 mmHg) e pH de 7,35 (concentração do íon hidrogênio de 51 nmol/L); a concentração de bicarbonato era de 35 mmol/L (valores de referência na Tabela 25.2).

Comentário

Esta paciente apresentava uma exacerbação da **doença pulmonar obstrutiva crônica** (DPOC) e acidose respiratória. A pCO_2 estava elevada e, consequentemente, a ventilação estava dependente do estímulo da hipoxia. A concentração de bicarbonato também estava elevada, em consequência da compensação metabólica da acidose respiratória. O tratamento desses pacientes com elevadas concentrações de oxigênio deve ser feito cautelosamente, porque o aumento da pO_2 pode eliminar o estímulo hipóxico e provocar depressão respiratória. A monitorização da pO_2 e pCO_2 arteriais durante a oxigenioterapia é mandatória. Esta paciente foi tratada eficazmente com oxigênio a 28%.

A ventilação e perfusão pulmonares em conjunto determinam as trocas gasosas

O fornecimento de sangue aos alvéolos pulmonares é feito pelas artérias pulmonares que transportam sangue desoxigenado a partir da periferia, passando através do ventrículo direito. Após sua oxigenação nos pulmões, o sangue flui através das veias pulmonares até a aurícula esquerda. Nos capilares alveolares dos pulmões, o sangue aceita oxigênio, que se difunde através da parede alveolar a partir do ar inspirado; simultaneamente o CO_2 se difunde do sangue para os alvéolos (Fig. 25.5) e é removido com o ar expirado.

A taxa de difusão dos gases para dentro e para fora do sangue é determinada pela diferença de pressões parciais entre o ar alveolar e o sangue. A Tabela 25.3 mostra a pO_2 e

a pCO_2 nos pulmões. Comparando com o ar atmosférico, a pCO_2 no ar alveolar é ligeiramente mais alta e a pO_2 é ligeiramente mais baixa (isso se deve à pressão do vapor de água). O dióxido de carbono é muito mais solúvel em água do que o oxigênio e equilibra-se com o sangue de forma mais rápida. Desta forma, quando se desenvolvem anomalias, observa-se primeiro uma diminuição da pO_2 no sangue (hipoxia). O aumento da pCO_2 (hipercapnia) ocorre mais tardiamente e usualmente indica a presença de doença mais grave. O outro principal fator determinante das trocas gasosas é a velocidade com que o sangue flui através dos pulmões (a taxa de perfusão). Normalmente, a taxa de ventilação alveolar é de aproximadamente 4 L/min, e a de perfusão de 5 L/min (a razão da ventilação para a perfusão (Va/Q) é de 0,8).

Tabela 25.3

Pressões parciais de oxigênio e dióxido de carbono no ar atmosférico, alvéolos pulmonares e sangue (kPa [mmHg])

	Ar seco	Alvéolos	Artérias sistêmicas	Tecido
pO_2	21,2(39)	13,7(98)	12(90)	5,3(40)
pCO_2	<0,13(0,1)	5,3(40)	5,3(40)	6,0(45)
Vapor de água		6,3(47)		

Os gradientes das pressões parciais determinam a difusão de gases através da barreira alveolar/sangue (1 kPa = 7,5 mmHg).

Diferentes combinações de perturbações da ventilação e da perfusão podem ocorrer

Em condições patológicas, algumas partes do pulmão podem estar bem perfundidas, mas deficientemente ventiladas. Isso ocorre quando alguns alvéolos colapsam e se tornam incapazes de realizar trocas gasosas. Como resultado, a pO_2 sanguínea diminui, uma vez que não há difusão de oxigênio a partir do ar alveolar. A presença de sangue pobre em oxigênio na circulação arterial é conhecida como **"efeito *shunt*".** Por outro lado, quando a ventilação é adequada, mas a perfusão é deficiente, as trocas gasosas não podem ocorrer: nestes casos, parte do pulmão se comporta como se não tivesse alvéolos, formando o **"espaço morto fisiológico".** Exemplos de patologias relacionadas com ventilação deficiente, perfusão deficiente ou combinação de ambas são dados abaixo:

- Deformações da caixa torácica comprometem a ventilação ao limitarem o movimento pulmonar.
- Traumatismos torácicos podem diminuir a ventilação como resultado de colapso pulmonar, comprometendo a ventilação.
- Os alvéolos podem ser realmente destruídos no enfisema pulmonar.
- A síntese inadequada de surfactante leva ao colapso dos alvéolos, ao comprometimento da ventilação e à síndrome de dificuldade respiratória.
- Obstrução ou estreitamento da árvore brônquica (uma obstrução mecânica por objetos inalados ou o estreitamento por um tumor em crescimento): compromete a

ventilação.

- A constrição brônquica ocorre na asma, comprometendo a ventilação.
- A eficiência da ventilação pode ser reduzida pelo comprometimento da elasticidade do pulmão ou por disfunção de músculos relevantes (o diafragma e os músculos intercostais da parede torácica).
- A presença de fluido nos alvéolos (edema pulmonar) compromete a ventilação ao afetar a difusão dos gases.
- Defeitos no controle neurológico comprometem a ventilação ao afetarem o movimento pulmonar.
- A perfusão pulmonar está comprometida em problemas circulatórios como o choque e a insuficiência cardíaca.

A Tabela 25.4 enumera as condições patológicas relacionadas com as trocas gasosas.

Tabela 25.4

As pressões parciais de oxigênio e dióxido de carbono no sangue dependem da perfusão e ventilação pulmonar

	pO_2 alveolar	pCO_2 alveolar	pO_2 arterial	pCO_2 arterial	Comentário
Ventilação deficiente, perfusão adequada	↓	↑	↓	Normal	*Shunt* fisiológico
Ventilação adequada, perfusão deficiente	↑	↓	↓*	↑*	Espaço morto fisiológico

*Dependendo do nível de shunt.

O transporte de dióxido de carbono pelos eritrócitos

Os eritrócitos transportam CO_2 para os pulmões em uma forma "fixa" — como bicarbonato

O metabolismo humano produz CO_2 a uma taxa de 200-800 mL/min. O CO_2 se dissolve em água e gera ácido carbônico que, por sua vez, se dissocia em íons hidrogênio e bicarbonato. Assim, o CO_2 gera grandes quantidades de íons hidrogênio:

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$$

No plasma, a reação anterior é não enzimática e desenvolve-se lentamente, produzindo apenas quantidades mínimas de ácido carbônico, que permanece em equilíbrio com a grande quantidade de CO_2 dissolvido. No entanto, a mesma reação nos eritrócitos é catalisada pela anidrase carbônica, que "fixa" o CO_2 como bicarbonato. O íon hidrogênio gerado é tamponado pela hemoglobina.

O íon bicarbonato produzido pela reação da anidrase carbônica eritrocitária se desloca para o plasma por troca com o íon cloreto (a "troca do cloreto") (Fig. 25.6). Até cerca de 70% de todo o CO_2 produzido nos tecidos se torna bicarbonato; aproximadamente 20% são transportados "fixos" à hemoglobina como grupos carbamino; e apenas 10% permanecem dissolvidos no plasma.

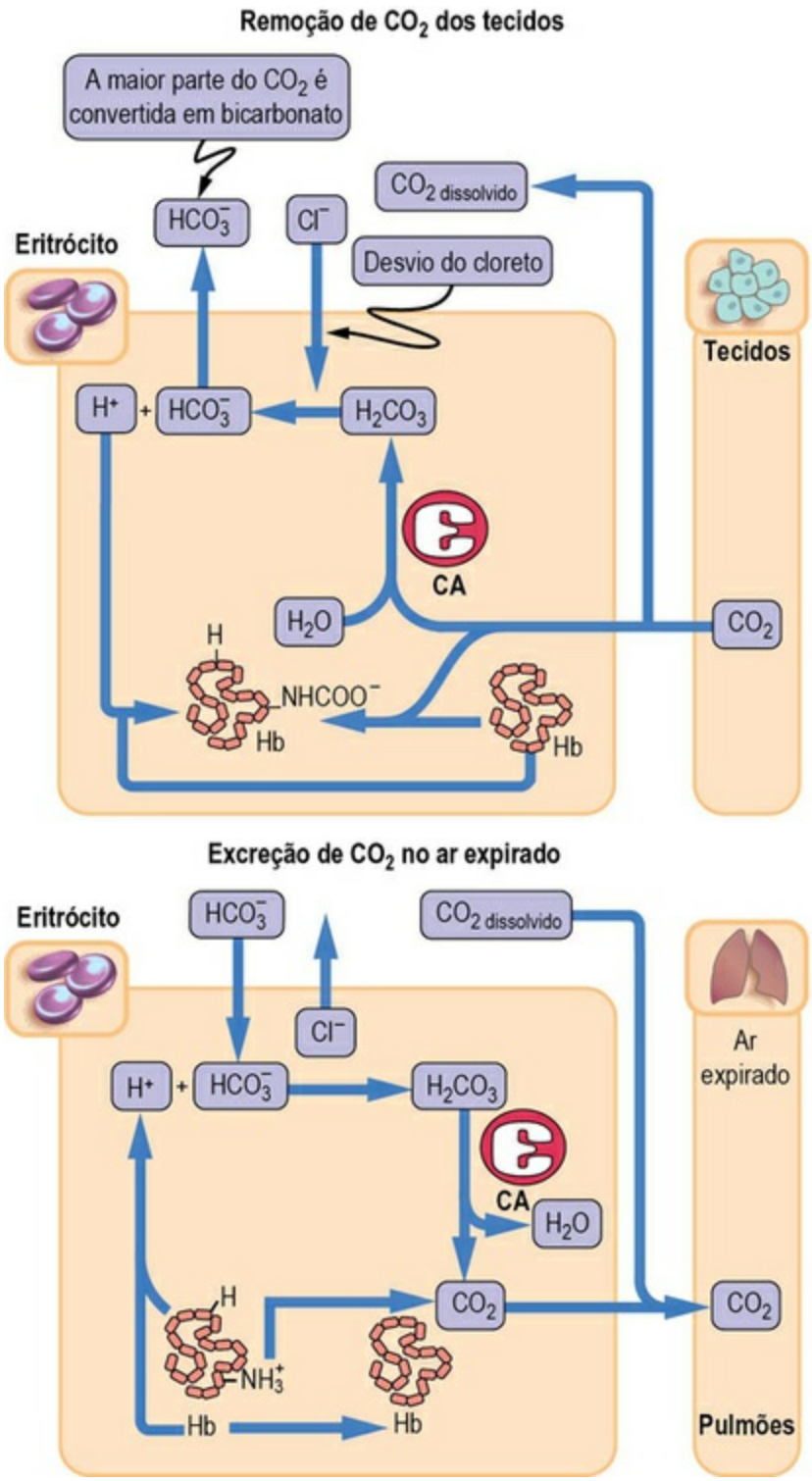


FIG. 25.6 Transporte de CO_2 pelos eritrócitos.
A anidrase carbônica do eritrócito converte aproximadamente 70% do CO_2 produzido nos tecidos em bicarbonato para ser transportado para os pulmões; aproximadamente 20% de todo o CO_2 é transportado ligado à hemoglobina, sob a forma de carbamatos ($-NHCOO^-$), e o restante como gás dissolvido no plasma. CA, anidrase carbônica.

Nos pulmões, a pO_2 mais elevada facilita a dissociação do CO_2 da hemoglobina. Isto é conhecido como **efeito Haldane.** A hemoglobina libera o seu íon hidrogênio, que reage com o bicarbonato e forma o ácido carbônico que, por sua vez, libera CO_2.

Transporte de bicarbonato pelos rins

Os rins controlam a concentração plasmática de bicarbonato e a remoção do íon hidrogênio. À semelhança dos eritrócitos, as células tubulares renais (proximais e distais) contêm anidrase carbônica.

Os túbulos proximais reabsorvem bicarbonato no processo ajudado pela anidrase carbônica

Em condições normais, o bicarbonato é reabsorvido no túbulo proximal, encontrando-se praticamente ausente na urina. A superfície das células tubulares renais voltadas para o lúmen é impermeável ao bicarbonato. O bicarbonato filtrado se liga ao íon hidrogênio secretado pelas células formando o ácido carbônico, que é então convertido em CO_2 pela anidrase carbônica localizada na membrana luminal. O CO_2 se difunde para as células, onde é convertido pela anidrase carbônica intracelular novamente em ácido carbônico, que então se dissocia em íons hidrogênio e bicarbonato. O bicarbonato regressa ao plasma, e o íon hidrogênio é secretado no lúmen tubular para a captura de mais bicarbonato filtrado. Observe que nesse processo o íon hidrogênio é exclusivamente utilizado para permitir a reabsorção do bicarbonato, e no contexto global não existe excreção deste íon (Fig. 25.7).

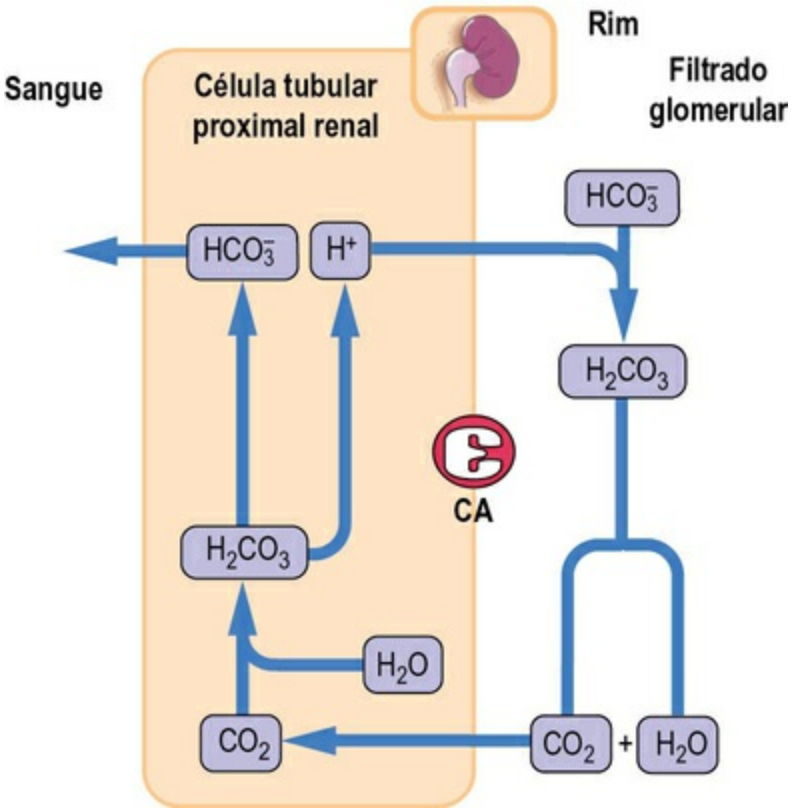


FIG. 25.7 Reabsorção de bicarbonato no rim.
A reabsorção de bicarbonato ocorre no túbulo proximal. Neste segmento, não ocorre excreção efetiva de íon hidrogênio. CA, anidrase carbônica.

Os túbulos distais formam novamente bicarbonato e excretam hidrogênio

A situação é diferente no túbulo distal em que ocorre formação de bicarbonato. O

mecanismo é idêntico ao da reabsorção de bicarbonato, mas nesse caso vai haver de fato quer uma perda de íons hidrogênio do organismo quer um ganho de bicarbonato. O CO_2 se difunde para as células. No túbulo distal, a anidrase carbônica converte-o em ácido carbônico, que se dissocia em íon hidrogênio e bicarbonato. O bicarbonato é transportado para o plasma e o íon hidrogênio é secretado no lúmen tubular. No entanto, não vai haver bicarbonato presente no lúmen do túbulo distal (foi todo reabsorvido anteriormente) e os íons hidrogênio são tamponados (aprisionados) por íons fosfato presentes no filtrado e pela amônia formada nos túbulos proximais. Subsequentemente são excretados na urina (Fig. 25.8).

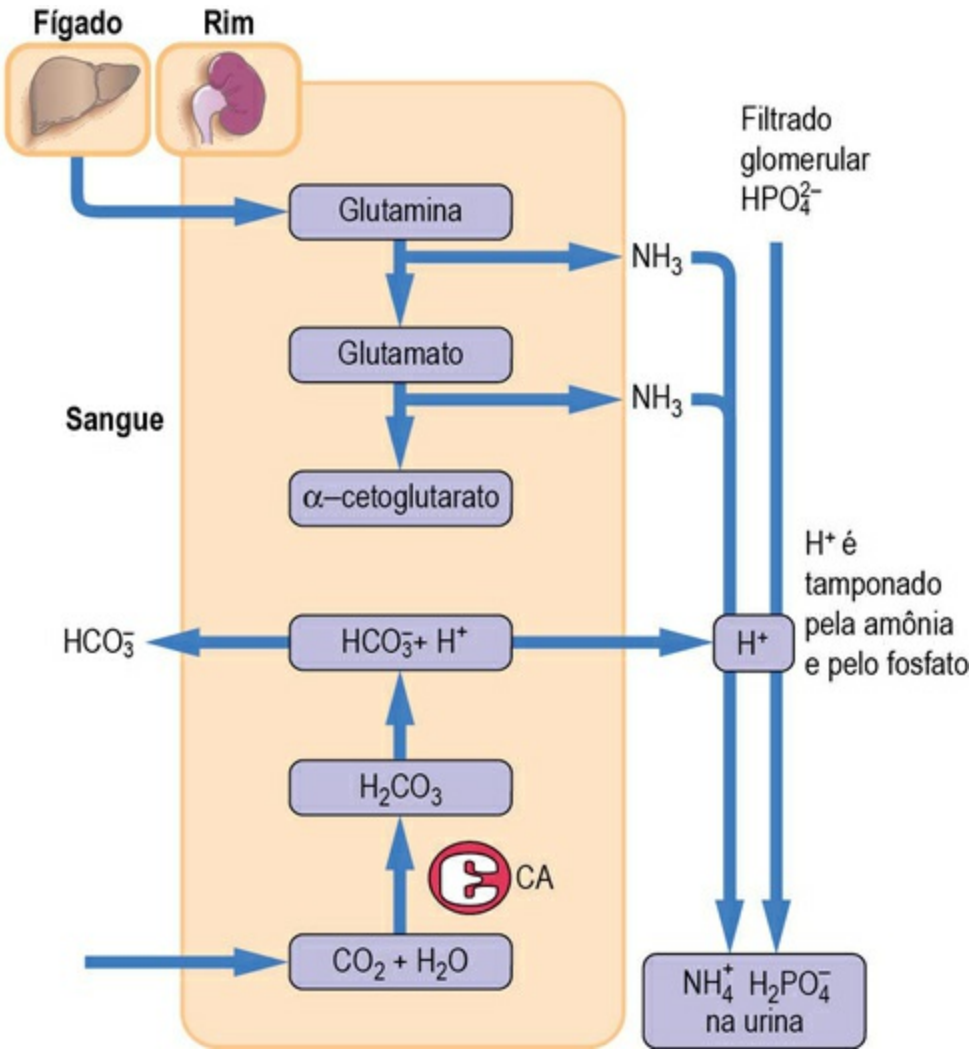


FIG. 25.8 Excreção do íon hidrogênio pelo rim.
A excreção do íon hidrogênio ocorre nos túbulos distais. O íon hidrogênio reage com a amônia formando o íon amônio. O íon hidrogênio é também tamponado no lúmen tubular pelo fosfato. A excreção diária do íon hidrogênio é de aproximadamente 50 mmol. CA, anidrase carbônica.

A amônia formada na reação catalisada pela glutaminase participa na excreção do íon hidrogênio

A amônia é formada durante a transformação de glutamina em ácido glutâmico em uma reação catalisada pela glutaminase. A amônia se difunde através da membrana luminal, permitindo que o íon hidrogênio fique retido dentro do túbulo sob a forma de íon

amônio **(NH_4^+),** ao qual a membrana é impermeável.

Distúrbios do equilíbrio acidobásico

Classificação dos distúrbios acidobásico

O conceito dos componentes respiratório e metabólico do equilíbrio acidobásico é a base da classificação dos distúrbios do equilíbrio acidobásico (Fig. 25.3). Estes são divididos em acidose e alcalose. A acidose é o processo que leva à acumulação do íon hidrogênio. A alcalose causa a diminuição da concentração de íon hidrogênio (acidemia e alcalemia são termos que apenas descrevem o pH sanguíneo). Assim, a acidose e a alcalose resultam em acidemia e alcalemia, respectivamente (ver Quadro Clínico nesta página).

Existem quatro distúrbios principais do equilíbrio acidobásico

A chave para prosseguir com a classificação é a "localização" da causa primária nos componentes respiratório ou metabólico do sistema. Se a causa primária é a alteração da pCO_2, a acidose ou alcalose é classificada como **respiratória,** se é a alteração do bicarbonato, a acidose ou alcalose é classificada como **metabólica.** Assim, existem quatro distúrbios principais do equilíbrio acidobásico: **acidose respiratória, acidose metabólica, alcalose respiratória** e **alcalose metabólica** (Fig. 25.3). Contudo, também se podem desenvolver distúrbios mistos, que serão considerados adiante.



Quadro clínico

Definições essenciais

Um **ácido,** de acordo com a definição de Brønsted-Lowry, é "uma espécie molecular que tem tendência para ceder um íon hidrogênio, formando uma base conjugada".
Acidemia é um excesso de íon hidrogênio no sangue.
Alcalemia é a concentração diminuída de íon hidrogênio no sangue.
Acidose é o processo que leva à acumulação do íon hidrogênio.
Alcalose é o processo que diminui a quantidade de íon hidrogênio.

O pulmão e o rim atuam em conjunto para minimizar variações no pH plasmático: esse mecanismo é conhecido como compensação dos distúrbios acidobásico

A acidose é acompanhada por uma diminuição do quociente entre o bicarbonato plasmático e a pCO_2, e a alcalose por um aumento desse quociente. Quando ocorre algum problema, os mecanismos de compensação são ativados para que a concentração de íon hidrogênio volte ao normal. Isso se traduz na normalização do quociente [bicarbonato]/pCO_2 na equação de Henderson-Hasselbalch.

Consequentemente, quando a acidose respiratória causa um aumento da pCO_2, o rim

vai aumentar a formação de bicarbonato, aumentando sua concentração plasmática e normalizando o quociente. Inversamente, quando a cetoacidose diabética causa depleção do bicarbonato plasmático, a taxa de ventilação aumenta, a pCO_2 diminui e o quociente bicarbonato/pCO_2 regressa ao normal. Enquanto a compensação respiratória pode ocorrer em minutos, a compensação metabólica demora horas a dias para se desenvolver na totalidade (Tabela 25.5).

Tabela 25.5

Compensação respiratória e metabólica dos distúrbios acidobásico

Distúrbio acidobásico	Alteração primária	Alteração compensatória	Período até a alteração compensatória
Acidose metabólica	↓ bicarbonato plasmático	↓ pCO_2 (hiperventilação)	Minutos/horas
Alcalose metabólica	↑ bicarbonato plasmático	↑ pCO_2 (hipoventilação)	Minutos/horas
Acidose respiratória	↑ pCO_2	↑ formação de bicarbonato no rim: ↑ bicarbonato plasmático	Dias
Alcalose respiratória	↓ pCO_2	↓ reabsorção de bicarbonato no rim: ↓ bicarbonato plasmático	Dias

A compensação respiratória e metabólica dos distúrbios acidobásico minimiza as alterações do pH sanguíneo. Uma alteração no componente respiratório leva à compensação metabólica e uma alteração no componente metabólico estimula a compensação respiratória.

Acidose

A acidose respiratória ocorre mais frequentemente no contexto de doença pulmonar e resulta de uma redução na ventilação

A causa mais comum é a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). Uma crise de asma grave pode resultar em acidose respiratória devido à constrição brônquica. A acidose respiratória acompanha frequentemente a hipoxia (insuficiência respiratória); neste caso, um aumento da pCO_2 muitas vezes ocorre em paralelo com uma redução da pO_2 (Tabela 25.6, Quadro Clínico p. 336).

Tabela 25.6

Causas dos distúrbios acidobásico

Acidose metabólica	Acidose respiratória	Alcalose metabólica	Alcalose respiratória
Diabetes melito (cetoacidose)	Doença pulmonar obstrutiva crônica	Vômitos (perda de íon hidrogênio)	Hiperventilação (ansiedade, febre)
Acidose lática (ácido lático)	Asma grave	Aspiração nasogástrica (perda de íon hidrogênio)	Doenças pulmonares associadas a hiperventilação
Insuficiência renal (ácidos inorgânicos)	Paragem cardíaca	Hipocalemia	Anemia
Diarreia grave (perda de bicarbonato)	Depressão do centro respiratório (fármacos, p. ex., opioides)	Administração intravenosa de bicarbonato (p. ex., após paragem cardíaca)	Envenenamento por salicilatos
Drenagem cirúrgica do intestino (perda de bicarbonato)	Falência dos músculos respiratórios (p. ex., poliomielite, esclerose múltipla)		
Perda renal de bicarbonato (acidose tubular renal tipo 2 — rara)	Deformidades torácicas		
Acidose tubular renal — rara	Obstrução da via aérea		

A **acidose respiratória** é comum e é causada primariamente por doenças pulmonares que afetam as trocas gasosas. A **alcalose respiratória** é rara e é causada por hiperventilação, que reduz a pCO_2. A **acidose metabólica** é comum e resulta tanto da produção em excesso como da retenção de ácidos não voláteis na circulação. A **alcalose metabólica** é mais rara: suas causas mais comuns são vômitos e aspiração gástrica, ambas causando perda de íon hidrogênio do estômago.

A acidose metabólica resulta da produção excessiva, do metabolismo ineficiente ou da excreção insuficiente de ácidos não voláteis

Um exemplo clássico de acidose metabólica é a cetoacidose diabética, situação em que os cetoácidos, ácido acetoacético e ácido β-hidroxibutírico, se acumulam no plasma (Cap. 21). A acidose também pode ocorrer durante esforços físicos extremos, com acumulação de ácido lático gerado pelo metabolismo muscular; em circunstâncias normais, o lactato é rapidamente metabolizado após a interrupção do exercício. No entanto, quando são produzidas grandes quantidades de lactato como consequência de hipoxia, a acidose lática pode ser potencialmente fatal, como acontece, por exemplo, no choque (Tabela 25.6).



Quadro clínico

A alcalose respiratória é causada por hiperventilação

Um homem de 25 anos de idade foi admitido no hospital com uma crise de asma. O pico de fluxo expiratório máximo era de 75%. Na gasimetria apresentava pO_2 9,3 kPa

(70 mmHg) e pCO_2 4,0 kPa (30 mmHg), com pH 7,50 (concentração de íon hidrogênio = 42 nmol/L). Foi tratado com salbutamol nebulizado, um estimulante β_2-adrenérgico (Cap. 39) que atua como broncodilatador, e teve boa recuperação.

Comentário

A gasimetria do paciente apresenta um grau ligeiro de alcalose respiratória causada por hiperventilação e pelo "assoprar" do CO_2. A alcalose respiratória causa uma redução nos níveis séricos de cálcio ionizado, levando a irritabilidade neuromuscular. O comprometimento ventilatório com retenção de CO_2 e acidose respiratória é característico da asma grave. Os intervalos de referência são apresentados na Tabela 25.2.

A excreção de ácidos não voláteis também está afetada na insuficiência renal, o que leva igualmente a acidose metabólica. A insuficiência renal se desenvolve quando a perfusão dos rins não é adequada (p. ex., por traumatismo, choque ou desidratação) ou quando existe uma doença renal intrínseca como a glomerulonefrite (reação inflamatória no tecido tubular renal).

A perda excessiva de bicarbonato também pode ser uma causa de acidose metabólica. Esta causa é comum quando o bicarbonato presente no líquido intestinal é perdido como resultado de diarreia grave ou drenagem cirúrgica após cirurgia intestinal.

Anomalias na reabsorção de bicarbonato e na secreção de íon hidrogênio causam as raras acidoses tubulares renais

Alterações no controle renal de bicarbonato e íon hidrogênio originam um grupo de patologias relativamente raro, conhecido como acidoses tubulares renais (ATR). A ATR proximal é causada por uma reabsorção deficiente de bicarbonato, e a ATR distal ocorre devido à excreção deficiente de íon hidrogênio. A ATR proximal é geralmente acompanhada por outros defeitos nos mecanismos de transporte proximais (esta situação é conhecida como síndrome de Fanconi).

Geralmente, a acidose é uma condição muito mais comum do que a alcalose.

Alcalose

A alcalose é mais rara do que a acidose

Uma alcalose respiratória ligeira pode ser uma consequência da hiperventilação durante o exercício, ataques de ansiedade ou febre. Também pode ocorrer na gravidez. A alcalose metabólica está frequentemente associada a uma concentração sérica de potássio anormalmente baixa, como resultado do tamponamento celular. A entrada ou saída do íon potássio da célula está relacionada com o movimento de íon hidrogênio na direção oposta. Assim, **a alcalose pode provocar hipocalemia, e a hipocalemia (Cap. 22) pode levar à alcalose.** A alcalose metabólica grave pode também resultar da perda maciça de íon hidrogênio pelo estômago durante o vômito (Quadro Clínico nesta página), ou em

consequência de aspiração nasogástrica após cirurgia. Por último, também pode ocorrer após administração intravenosa de doses excessivas de bicarbonato: por exemplo, durante a ressuscitação em uma paragem cardíaca (Tabela 25.6).

Distúrbios acidobásico mistos

Pode existir mais do que um distúrbio acidobásico no mesmo paciente. O resultado é um distúrbio acidobásico misto, que oferece por vezes alguma dificuldade no diagnóstico (Quadro Clínico a seguir e Tabela 25.7).

Tabela 25.7

Comparação entre distúrbios simples e mistos do equilíbrio acidobásico

A. Acidose metabólica, respiratória e mista

Distúrbio	pH	pCO_2	Bicarbonato plasmático
Acidose metabólica	↓	↓ (compensação respiratória)	↓ (alteração primária)
Acidose respiratória	↓	↑ (alteração primária)	↑ (compensação metabólica)
Acidose mista respiratória e metabólica	↓↓	↑ (acidose respiratória)	↓ (acidose metabólica)

B. Alcalose metabólica, respiratória e mista (rara)

Distúrbio	pH	pCO_2	Bicarbonato plasmático
Alcalose metabólica	↑	↑ (compensação respiratória)	↑ (alteração primária)
Alcalose respiratória	↑	↓ (alteração primária)	↓ (compensação metabólica)
Alcalose mista respiratória e metabólica	↑↑	↓ (alcalose respiratória)	↑ (alcalose metabólica)

Os distúrbios acidobásico mistos resultam em uma alteração maior do pH sanguíneo relativamente aos distúrbios simples; podem colocar dificuldades no diagnóstico.



Quadro clínico

O vômito pode causar alcalose metabólica

Um homem de 47 anos de idade recorre à clínica de ambulatório por história de vômitos profusos intermitentes e perda de peso. Apresentava taquicardia, redução do turgor tecidual e hipotensão. O pH sanguíneo era de 7,55 (concentração de íon hidrogênio de 28 nmol/L) e a pCO_2 de 6,4 kPa (48 mmHg). A concentração de bicarbonato era de 35 mmol/L e apresentava também hiponatremia e hipocalemia.

Comentário

Este paciente apresentava alcalose metabólica causada pela perda de íon hidrogênio

pelo vômito. Os exames mostraram uma obstrução ao esvaziamento gástrico devido à cicatrização de uma ulceração péptica crônica. Foi submetido à cirurgia para corrigir a estenose pilórica, com boa evolução. É importante salientar o aumento da pCO_2 como resultado da compensação respiratória da alcalose metabólica.

Resumo

- A manutenção da concentração do íon hidrogênio dentro de um estreito intervalo é vital para a sobrevivência.
- O equilíbrio acidobásico é regulado pela ação conjunta dos pulmões e dos rins. Os eritrócitos desempenham um papel importante no transporte de dióxido de carbono no sangue.
- Os principais tampões no sangue são a hemoglobina e o bicarbonato, enquanto nas células são as proteínas e o fosfato. O sistema tampão do bicarbonato comunica com o ar atmosférico.
- Os distúrbios acidobásico são a acidose e a alcalose, e cada um deles pode ser de origem metabólica ou respiratória.
- As determinações de pH, pCO_2 e bicarbonato, e pO_2 são investigações de primeira linha e são frequentemente requisitadas em serviços de urgência.



Quadro clínico

Os distúrbios respiratórios e metabólicos do equilíbrio ACIDOBÁSICO podem ocorrer simultaneamente: paragem cardíaca

Durante a ressuscitação de um homem de 60 anos de idade em paragem cardiorrespiratória, a gasimetria revelou pH de 7,0 (concentração de íon hidrogênio de 100 nmol/L) e pCO_2 de 7,5 kPa (52 mmHg). A concentração de bicarbonato era de 11 mmol/L. A pO_2 era de 12,1 kPa (91 mmHg) durante tratamento com oxigênio a 48%.

Comentário

Este paciente apresenta um distúrbio misto: uma acidose respiratória causada pela ausência de ventilação e uma acidose metabólica causada pela hipoxia, que ocorreu antes de se instituir terapia com oxigênio. A acidose foi causada por acumulação de ácido lático: a concentração de lactato medida foi de 7 mmol/L (intervalo de referência de 0,7-1,8 mmol/L (6-16 mg/dL)). Os termos acidose e alcalose não descrevem apenas as alterações no pH sanguíneo: estão relacionados com os processos que resultam nestas alterações. Portanto, em alguns casos, podem ocorrer dois processos independentes: por exemplo, um paciente pode ser admitido no hospital por cetoacidose diabética e ter um enfisema concomitante causando acidose respiratória. O resultado final pode ser uma alteração mais grave no pH do que seria esperado com um distúrbio simples (Tabela 25.5). Qualquer associação de distúrbios pode ocorrer; o conhecimento de um

médico experiente é geralmente necessário para que se estabeleça um diagnóstico.

Questões para aprendizagem

1. Descreva como o tampão bicarbonato lida com a adição de um ácido ao sistema.
2. Compare a regulação do bicarbonato pelos túbulos proximal e distal no rim.
3. Explique a função da ventilação nos distúrbios acidobásico.
4. Que distúrbios do equilíbrio acidobásico podem estar associados a uma cirurgia gastrintestinal?
5. Discuta a associação entre os distúrbios acidobásico e a concentração plasmática de potássio.

Leituras sugeridas

Corey, H. E. Bench-to-bedside review: Fundamental principles of acid–base balance. *Critical Care*. 2005; 9:184–192.

Kellum, J. A. Disorders of acid–base balance. *Crit Care Med*. 2007; 35:2630–2636.

Sites

Appel SJ, Downs CA. Understanding acid–base balance, Nursing: Fall 38:9-11, 2008. http://journals.lww.com/nursing/Fulltext/2008/09002/Understanding_acid_base_balance.3.aspx

McNamara J, Worthley LIG. Acid–Base Balance: Part I. Physiology, Critical Care and Resuscitation 3:181-187, 2001. http://cicm.org.au/journal/2001/september/ABa1.pdf

Neligan PJ, Deutschman CS. Acid–base balance in critical care medicine. www.ccmtutorials.com/renal/Acid%20Base%20Balance%20in%20Critical%20Care%20Medicine-NELIGAN.pdf

Respiratory Acid/Base Balance, Gas Transport and Erythrocytes. www.sci.utah.edu/~macleod/bioen/be6000/notes/L14-acid–base.pdf

CAPÍTULO 26

Metabolismo do Osso e Homeostase do Cálcio

Marek H. Dominiczak and William D. Fraser

Objetivos

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever a composição química do osso e o processo de mineralização ósseo.
- Reconhecer as principais células ósseas e suas interações no ciclo de remodelamento ósseo.
- Compreender o papel dos principais fatores que contribuem para a regulação da concentração de cálcio no soro.
- Explicar o papel principal da proteína relacionada ao paratormônio na hipercalcemia maligna.
- Entender o papel da vitamina D e o seu metabolismo em condições normais e patológicas.
- Definir a osteoporose e suas causas.

Introdução

Muitas funções celulares dependem do controle rigoroso da concentração extracelular de cálcio.

Estas incluem a transmissão neural, a secreção celular, a contração de células musculares, a proliferação celular, a permeabilidade das membranas celulares, a coagulação sanguínea e a mineralização óssea. O osso funciona como reservatório de cálcio em caso de deficiência, e como sua reserva quando o organismo se encontra abastecido de cálcio. O esqueleto contém 99% do cálcio presente no organismo na forma de hidroxiapatite; o restante se encontra distribuído pelos tecidos moles, dentes e fluido extracelular (ECF).

Estrutura óssea e remodelamento ósseo

O osso é um tecido conjuntivo especializado que, juntamente com a cartilagem, forma o sistema esquelético

Além de fornecer suporte e proteção, o osso é um local de intensa atividade metabólica. Dois tipos de ossos são conhecidos: o osso espesso, denso e calcificado, localizado externamente (osso cortical ou compacto); e o osso esponjoso, uma rede de tecido calcificado com aspecto de favo de mel (osso trabecular).

O colágeno e a hidroxiapatita são os principais componentes da matriz óssea

O colágeno do tipo I é a proteína presente em maior porcentagem (90%) da matriz óssea (ver Quadro na p. 12). Os cristais de hidroxiapatita ricos em cálcio ($Ca_{10}[PO_4]_6[OH]_2$) são encontrados dentro e entre as fibras de colágeno. A associação da hidroxiapatita com o colágeno e a calcificação óssea são controladas, em parte, pela presença de glicoproteínas e proteoglicanos com alta capacidade de ligação iônica. As fibras de colágeno orientam-se de forma a apresentar maior densidade por unidade de volume e estão dispostas em camadas, confeccionando uma estrutura lamelar que pode ser observada ao microscópio. As modificações pós-traducionais do colágeno resultam na formação de ligações cruzadas de pirrol e piridinolina intra e intermoleculares. Esta microarquitetura permite ao osso funcionar como o principal reservatório de cálcio do corpo.

A matriz orgânica não calcificada presente no interior do osso, conhecida como osteoide, se torna mineralizada por meio de dois mecanismos. No espaço extracelular do osso, vesículas de matriz derivadas da membrana plasmática atuam como um foco para a deposição de fosfato de cálcio. A cristalização, por ventura, oblitera a membrana das vesículas, deixando uma coleção de cristais de hidroxiapatita agregados. Nesse ambiente, as células formadoras do osso **(osteoblastos)** secretam pacotes de proteínas de matriz que rapidamente mineralizam, e estas se combinam com cristais derivados das vesículas da matriz. O pirofosfato presente na matriz inibe este processo. A fosfatase alcalina secretada pelos osteoblastos destrói o pirofosfato, permitindo a prossecução da mineralização. A mineralização é altamente dependente de um suprimento adequado de cálcio e fosfato. Quando há carência desses minerais, a porcentagem de matriz orgânica não mineralizada (osteoide) dentro do osso aumenta, resultando na condição clínica conhecida como **osteomalácia.**

Mudanças constantes da estrutura óssea pelo remodelamento

Pequenas quantidades de cálcio são diariamente trocadas entre o osso e o fluido extracelular como resultado da constante remodelação óssea, isto é, de processos acoplados de reabsorção pelas células que reabsorvem o osso **(osteoclastos)** e de formação pelos osteoblastos (Fig. 26.1). Essa troca mantém um equilíbrio relativo de cálcio entre o osso recém-formado e o mais antigo. O osso sofre adaptação mecânica constante. O aumento da carga mecânica estimula a formação óssea, e o excesso da atividade dos osteoclastos está associado a diversas doenças, em particular a

osteoporose, a **artrite reumatoide** e a **metástase no câncer.**

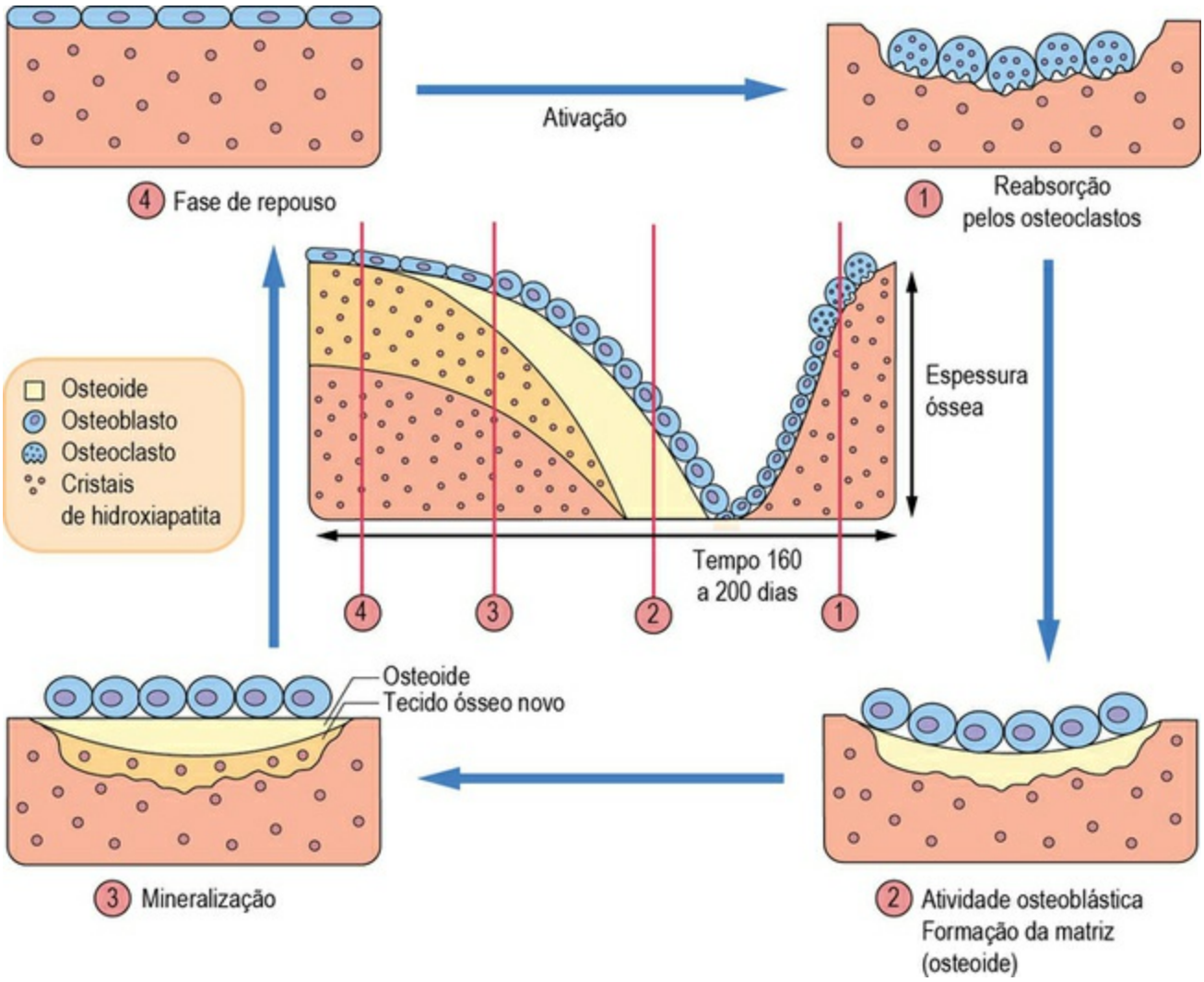


FIG. 26.1 A manutenção da massa óssea: o ciclo de remodelamento do osso. A reabsorção e a formação óssea pelos osteoclastos e osteoblastos estão acopladas. Os processos numerados de 1 a 4 são apresentados em um cronograma no painel central.

Os osteoclastos são as células responsáveis pela reabsorção óssea

Os osteoclastos são células gigantes multinucleadas (macrófagos específicos deste tecido). Eles são derivados de células mononucleares hematopoéticas pluripotentes provenientes da medula óssea e permanecem em contato com a superfície calcificada.

O receptor RANK e seu ligante RANKL são essenciais para a diferenciação, maturação e regulação dos osteoclastos

A maturação dos osteoclastos a partir de suas células progenitoras é dirigida por fatores de crescimento, em particular o fator estimulador de colônias de monócitos (M-CSF). Outro fator essencial é a proteína receptora de membrana estruturalmente relacionada com o receptor do fator de necrose tumoral, chamada **receptor ativador do fator nuclear NFκB** (RANK). Ele se liga à citocina relacionada com o TNF, denominada **ligante RANK** (RANKL). A ligação da RANKL ao RANK pode ser diminuída quando este se liga à **osteoprotegerina** (OPG), uma proteína que também pertence à superfamília dos

receptores de TNF. Em conjunto, a RANKL e a OPG controlam a diferenciação e a ativação dos osteoclastos. A RANKL estimula e a OPG inibe a reabsorção óssea. É de destacar que os estrogênios induzem a síntese de OPG.

O RANK controla o osteoclasto por meio de cascatas de sinalização intracelular e fatores de transcrição

Essencialmente, o RANK prepara o osteoclasto para reabsorver o osso. Ele estimula cascatas de sinalização intracelulares (Cap. 40) que, por sua vez, ativam fatores de transcrição que controlam genes. Também coopera com outros receptores membranares semelhantes a imunoglobulinas. A sinalização intracelular envolve, entre outras, moléculas adaptadoras conhecidas como fatores citoplasmáticos associados a receptores de TNF (TRAFs). Os TRAFs reúnem moléculas sinalizadoras adicionais e ativam vias envolvendo o NFκB e a proteína ativadora-1 (AP-1). Outras vias incluem a cinase terminal c-Jun, a proteína cinase ativada pelo estresse p38, a cinase regulada pelo sinal extracelular (ERK) e a via src, que envolve a fosfatidilinositol 3'-cinase (PI3K) e a cinase Akt (Cap. 40). O efeito disso é a ativação de um fator de transcrição conhecido como fator nuclear das células T ativadas-2 (NFAT2). O resultado final é a indução de genes codificantes da fosfatase ácida resistente ao tartarato, catepsina K, calcitonina e a β2 integrina, que controlam diretamente a reabsorção óssea. A reabsorção óssea pelos osteoclastos libera um conjunto de moléculas: peptídios do colágeno, fragmentos de ligações cruzadas da piridinolina e cálcio da matriz óssea (através da ação de enzimas lisossomais, colagenases e catepsinas). Os produtos da degradação do colágeno (hidroxiprolina) no soro e na urina e os fragmentos do colágeno (**telopeptídios aminoterminais e carboxiterminais** NTX e CTX, respectivamente) podem ser dosados em laboratórios clínicos.

O paratormônio contribui para a ativação dos osteoclastos

O paratormônio (PTH) ativa os osteoclastos indiretamente via osteoblastos e calcitonina. Fatores locais como as citocinas interleucina 1 (IL-1), o fator de necrose tumoral (TNF), o fator β da transformação do crescimento (TGF-β) e o interferon α (IFN-α) também são importantes reguladores dos osteoclastos e atuam por meio de RANKL e OPG.

Os osteoblastos são células formadoras de ossos

Os osteoblastos são derivados do mesênquima. Os osteoblastos maduros sintetizam colágeno tipo I, osteocalcina, proteínas de adesão celular (trombospondina, fibronectina, sialoproteína óssea e osteopontina), proteoglicanos e proteínas relacionadas ao crescimento que controlam a mineralização óssea.

A função dos osteoblastos é regulada por vários hormônios e fatores de crescimento

O PTH liga-se a um receptor específico, estimulando a produção de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP), o transporte de íons e aminoácidos e a síntese do colágeno. O calcitriol (1,25-di-hidroxicolecalciferol; $1,25(OH)_2D_3$) estimula a síntese de fosfatase

alcalina, de proteínas específicas do osso e da matriz e pode diminuir a secreção de osteocalcina. Fatores de crescimento, como o fator estimulador de osteoblastos 1 (OSF-1), TGF-β, fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF-1 e IGF-2) e o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) funcionam como reguladores autócrinos da função dos osteoblastos. Existem também proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) que pertencem à superfamília TGF-β. Os marcadores bioquímicos séricos que refletem a função dos osteoblastos são a **fosfatase alcalina específica dos ossos,** a **osteocalcina** e os marcadores de formação do colágeno: **o telopeptídio carboxiterminal do colágeno tipo I** (ICTP) **e os pró-peptídios amino e carboxiterminal do pró-colágeno tipo 1** (PINP, P1CP).

A proteína que é um membro da família de receptores de LDL possui um papel importante na diferenciação dos osteoblastos

São importantes duas vias de sinalização no desenvolvimento esquelético: a via Wnt/β-catenina e a via TGF-β/BMP (a Wnt é uma glicoproteína de sinalização amplamente distribuída, particularmente envolvida no desenvolvimento embrionário). A proteína relacionada com o receptor das LDL 5 (LRP5, Cap. 18), juntamente com outro receptor, ativa a via Wnt. Mutações do gene que codifica a LRP5 causam um aumento da massa óssea e formação de osso denso. Por outro lado, uma mutação que leve à perda da função gênica causa osteoporose.

Cálcio sérico

A concentração plasmática total de cálcio é mantida entre 2,2 e 2,60 mmol/L (8,8-10,4 mg/dL). O cálcio existe na circulação sob três formas. O **Ca^{2+} ionizado** é o mais importante, a forma fisiologicamente ativa do cálcio (50% do cálcio total). A maioria do cálcio remanescente é **ligado à proteína,** principalmente a **albumina** carregada negativamente (40%) e o resto é complexado a substâncias, tais como o citrato e o fosfato (10%).

Se a concentração de proteínas plasmáticas aumentar (como, por exemplo, na desidratação), o cálcio ligado a proteínas e o cálcio sérico total aumentam. Em condições de proteínas plasmáticas reduzidas (p. ex., doença hepática, síndrome nefrótica ou desnutrição), a concentração de cálcio ligado a proteínas é reduzida, diminuindo o cálcio total, embora o cálcio ionizado seja mantido no intervalo de referência. Em muitas doenças agudas e crônicas, a concentração de albumina diminui. Apesar de isso diminuir a concentração total de cálcio, não altera a concentração da fração ionizada. Desse modo, nos laboratórios clínicos, é usado o conceito de **"cálcio ajustado":** o valor medido é extrapolado para a concentração de albumina de 40 g/L (4 g/dL).

$$Ca^{2+}\ \text{corrigido} = Ca^{2+}\ \text{medido}\,(\text{mmol}/\text{L}) + 0,02\,(40 - \text{albumina}\,[\text{g}/\text{L}])$$

$$Ca^{2+}\ \text{corrigido} = Ca^{2+}\ \text{medido}\,(\text{mg/dL}) + 0,8\,(4,0 - \text{albumina}\,[\text{g/dL}])$$

Homeostase do cálcio

O paratormônio (PTH) responde às mudanças dos níveis de cálcio ionizado e de fosfato

O PTH é um hormônio peptídico de cadeia simples formado por 84 aminoácidos secretados pelas células principais das glândulas paratireoides. Uma diminuição no cálcio ionizado extracelular ou um aumento na concentração sérica de fosfato estimula sua secreção. A deficiência de magnésio severa crônica pode inibir sua secreção a partir das vesículas secretoras, e baixas concentrações de calcitriol interferem com a sua síntese. O $PTH_{(1\text{-}84)}$ é maioritariamente metabolizado em um fragmento aminoterminal $PTH_{(1\text{-}34)}$ biologicamente ativo e um fragmento carboxiterminal $PTH_{(35\text{-}84)}$ inativo (Fig. 26.2). A maioria das ações celulares do PTH são mediadas por sinalização das proteínas G e do cAMP.

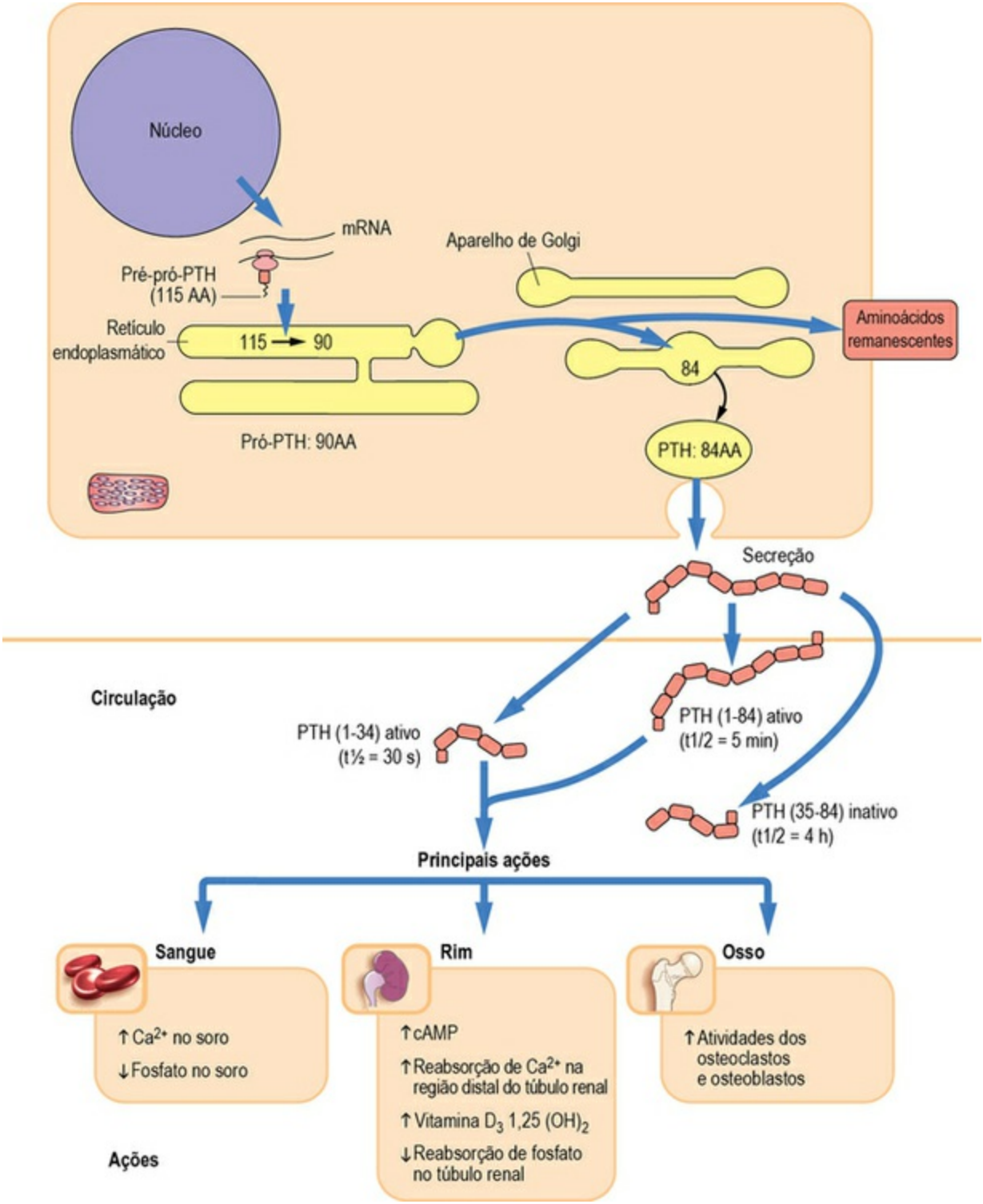


FIG. 26.2 A síntese e as principais ações do paratormônio (PTH). O PTH mobiliza o cálcio de todas as fontes disponíveis e diminui sua excreção renal. AA: aminoácidos.

Quando a concentração de Ca^{2+} plasmático diminui, o PTH é liberado pelas glândulas paratireoides, estimulando a reabsorção óssea pelos osteoclastos, a reabsorção do cálcio pelos rins e a absorção de cálcio pelo intestino delgado (mediada por calcitriol). A secreção de PTH é regulada por retroalimentação pelo cálcio: um aumento no cálcio diminui a secreção de PTH (Fig. 26.3).

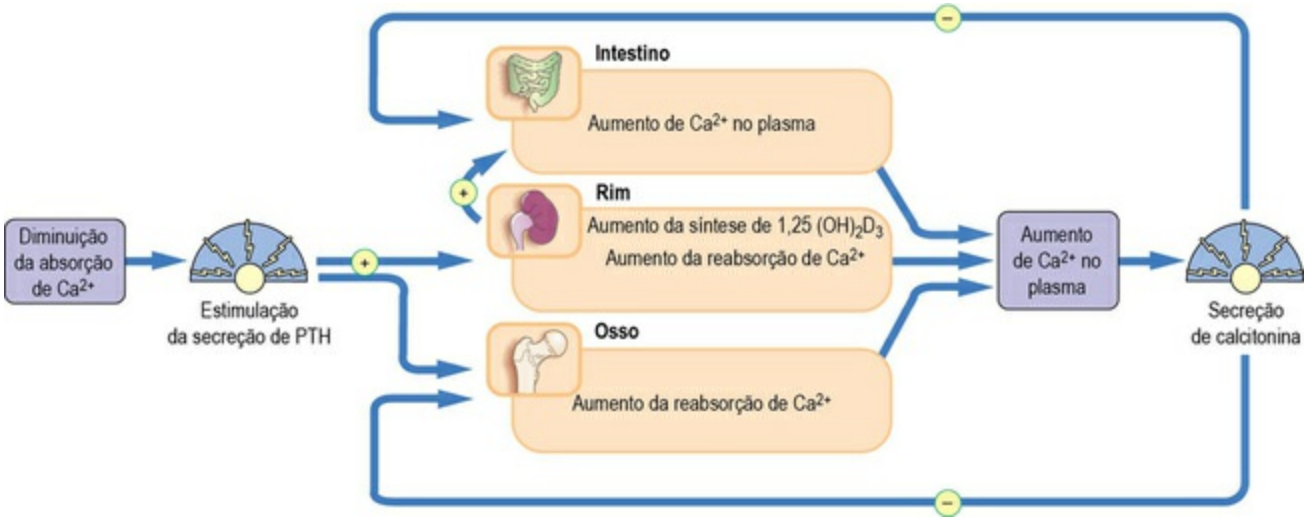


FIG. 26.3 Principais hormônios que influenciam a homeostase do cálcio. Uma diminuição da concentração de cálcio ionizado no plasma estimula a liberação de PTH; isso promove a reabsorção de Ca^{2+} pelos rins, a reabsorção óssea, e a absorção pelo intestino pelo aumento da produção de 1,25 $(OH)_2D_3$. Como resultado, a concentração de cálcio no plasma aumenta. Por sua vez, um aumento da concentração de cálcio ionizado no plasma estimula a liberação de calcitonina, que inibe a reabsorção de cálcio pelos rins e a reabsorção óssea mediada pelos osteoclastos.

O receptor sensível ao cálcio é um receptor de superfície acoplado à proteína G

O cálcio ionizado é mantido dentro de um limite restrito por meio de um receptor extracelular sensível ao cálcio (CaSR). Esse receptor está acoplado a uma proteína G e se localiza na superfície das células principais da glândula paratireoide, bem como das células C da glândula tireoide e ao longo dos túbulos renais. Pequenas mudanças nos níveis de cálcio ionizado modulam as funções celulares para manter a normocalcemia.

A vitamina D é sintetizada na pele por radiação UV

A vitamina D_2 (**ergocalciferol)** é sintetizada na pele pela radiação UV do ergosterol e a vitamina D_3 (colecalciferol) pela irradiação UV do 7-desidrocolesterol. A vitamina D_3 e seus metabólitos hidroxilados são transportados no plasma ligados a uma globulina específica, a proteína de ligação da vitamina D (DBP). O colecalciferol também é encontrado na dieta, e sua absorção está associada a outras gorduras, sendo transportado para o fígado em quilomícrons. No fígado, a vitamina D_3 é liberada dos quilomícrons pela DBP e hidroxilada na posição 25, formando o **calcidiol** (25-hidroxicolecalciferol; $25(OH)D_3$). O metabolismo da vitamina D está ilustrado na Figura 26.4.

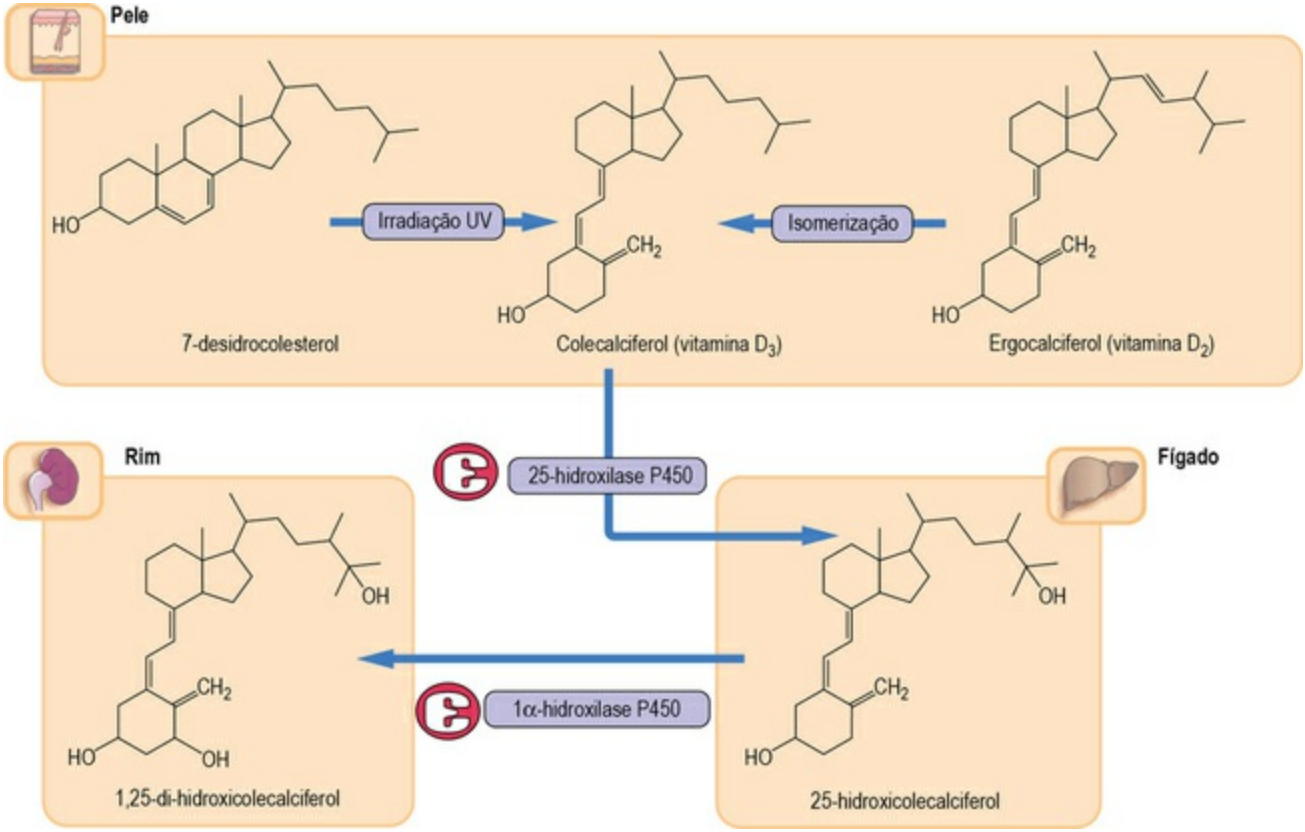


FIG. 26.4 O metabolismo da vitamina D. A vitamina D é principalmente sintetizada em resposta à ação da luz solar na pele; um componente menor é proveniente da dieta. O funcionamento normal do fígado e dos rins é essencial para a síntese da forma ativa 1,25 $(OH)_2D_3$. A concentração plasmática de cálcio controla os níveis de 1,25 $(OH)_2D_3$ pelo paratormônio. Observe que ambas as enzimas hidroxilases pertencem à superfamília do citocromo P450. 1,25$(OH)_2D_3$, 1,25-di-hidroxicolecalciferol, calcitriol, 1,25$(OH)_2D_3$; 25-hidroxicolecalciferol, calcidiol, 25$(OH)D_3$.

O calcidiol é a principal forma de armazenamento de vitamina D no fígado

A etapa de 25-hidroxilação é realizada por uma enzima microssomal hepática. O conteúdo hepático de 25$(OH)D_3$ regula a taxa de 25-hidroxilação. A 25$(OH)D_3$, a principal forma de vitamina encontrada tanto no fígado quanto na circulação encontra-se ligada à DBP, e seus níveis na circulação refletem os estoques hepáticos desta vitamina. Uma proporção significativa de 25$(OH)D_3$ é submetida à circulação êntero-hepática, sendo excretada na bile e reabsorvida no intestino delgado. Qualquer distúrbio na circulação êntero-hepática pode levar a uma carência desta vitamina.

O calcitriol (1α,25-di-hidroxicolecalciferol; 1,25$(OH)_2D_3$) é o metabólito ativo da vitamina D

A 25$(OH)D_3$ é hidroxilada na posição 1 por enzimas presentes principalmente nos túbulos renais, embora tal reação também possa ocorrer nos ossos e na placenta. A 1α-hidroxilase da 25$(OH)D_3$ é uma enzima mitocondrial. O produto, **calcitriol** (1,25$(OH)_2D_3$) é o metabólito da vitamina D mais potente e a única forma natural ativa em concentrações fisiológicas. A atividade da 1α-hidroxilase é estimulada pelo PTH, por baixas concentrações de fosfato ou cálcio no soro, pela deficiência de vitamina D, pela calcitonina, pelo hormônio do crescimento, além da prolactina e do estrogênio. Por sua

vez, sua atividade é inibida por *feedback* pela 1,25 $(OH)_2D_3$, pela hipercalcemia, por altas concentrações de fosfato e no hipoparatireoidismo.



Quadro clínico

Uma senhora com muita dor nas costelas do lado direito do corpo: hiperparatireoidismo primário

Uma senhora de 52 anos apresentou-se no setor de emergência do hospital local de sua cidade sofrendo de muita dor nas costelas do lado direito do corpo. Detectou-se sangue no exame de urina e a radiografia revelou a presença de pedras nos rins. A dor foi controlada com analgesia opioide. Uma investigação mais aprofundada revelou histórico de depressão recente, fraqueza generalizada, indigestão recorrente e dores em ambas as mãos. A concentração de cálcio corrigido no soro foi de 3,2 mmol/L (12,8 mg/dL; faixa normal: 2,2- 2,6 mmol/L, 8,8-10,4 mg/dL), de fosfato sérico 0,65 mmol/L (2,0 mg/dL; faixa normal: 0,7-1,4 mmol/L, 2,2-5,6 mg/dL) e de PTH 16,9 pmol/L (169 pg/mL; faixa normal: 1,1-6,9 pmol/L, 11-69 pg/mL).

Comentário

A maioria dos pacientes com HPT primário é agora identificada quando a hipercalcemia assintomática é descoberta em testes bioquímicos de rotina. O HPT primário clássico afeta o esqueleto, os rins e o trato gastrintestinal, resultando em uma tríade de queixas bem conhecida, descrita como "ossos, pedras e roncos abdominais". As queixas mais comuns são aquelas relacionadas à presença de pedras nos rins.

A 1,25$(OH)_2D_3$ também é transportada no plasma ligada à DBP. A vitamina D pode ser descrita como um **hormônio.** Nas células do epitélio intestinal, esta vitamina liga-se a um receptor citoplasmático da mesma forma que outros hormônios esteroides (Caps. 17 e 35). Este complexo proteína-ligante é transportado para o núcleo onde induz a expressão gênica.

Os túbulos renais, a cartilagem, o intestino e a placenta também contêm a 24-hidroxilase, produzindo o 24,25-di-hidroxicolecalciferol inativo (24,25$[OH]_2D_3$). A concentração de 24,25$(OH)_2D_3$ na circulação está reciprocamente relacionada ao nível de 1,25$(OH)_2D_3$.

A 1,25$(OH)_2D_3$ aumenta a absorção de cálcio e fosfato pelo intestino via transporte ativo por meio de proteínas que se ligam ao cálcio

Juntamente com o PTH, a 1,25$(OH)_2D_3$ estimula a reabsorção óssea pelos osteoclastos. Este efeito aumenta as concentrações de cálcio e fosfato no plasma. Baixas concentrações de 1,25$(OH)_2D_3$ causam uma mineralização anormal do osteoide recém-formado. Isto é resultado da baixa disponibilidade de cálcio e de fosfato, e da diminuição da função do osteoblasto, levando ao desenvolvimento do **raquitismo** (em crianças) ou da **osteomalácia**

(em adultos).

A calcitonina inibe a reabsorção óssea

A calcitonina é um peptídio de 32 aminoácidos sintetizado e secretado principalmente pelas células parafoliculares da glândula tireoide (células C). Sua secreção é regulada pelo cálcio do soro por meio do receptor sensível ao cálcio (CaSR): um aumento dos níveis de cálcio no soro resulta em um aumento proporcional nos de calcitonina, assim como uma diminuição dos níveis de cálcio no soro provoca uma redução correspondente nos de calcitonina. A estimulação crônica ocasiona uma exaustão da reserva secretora das células C. O papel biológico preciso da calcitonina não é conhecido, mas seu efeito principal é a inibição da reabsorção óssea pelos osteoclastos (Fig. 26.3).

O cálcio é absorvido no intestino delgado e excretado nas fezes e na urina

O cálcio é absorvido predominantemente na parte proximal do intestino delgado. É regulado pela quantidade de cálcio ingerida na dieta e por dois processos de transporte celular: a absorção transcelular saturável ativa estimulada pela 1,25 $(OH)_2D_3$ e a absorção paracelular não saturável controlada pela concentração de cálcio na luz intestinal em relação à sua concentração no soro.

Em um adulto normal em dieta ocidental, a quantidade de cálcio ingerida e sua deposição no osso correspondem à sua excreção nas fezes e na urina. Durante o crescimento, a criança pode apresentar um equilíbrio positivo de cálcio, enquanto indivíduos idosos, um equilíbrio negativo. A mudança na absorção de cálcio é um reflexo de alterações no consumo de cálcio pela dieta, da solubilidade do cálcio no intestino e do metabolismo da vitamina D.

Normalmente, à medida que a concentração de cálcio no soro aumenta, sua excreção também aumenta. Na hipercalcemia causada por **hiperparatireoidismo,** o PTH promove a reabsorção do cálcio filtrado no túbulo renal. Isto diminui os efeitos da filtração intensa e da inibição de sua reabsorção tubular renal, que ocorrem em resposta ao aumento da concentração do cálcio no soro. Por sua vez, a diminuição da concentração de cálcio no soro está associada à redução de sua excreção urinária, principalmente como um resultado da queda da quantidade de cálcio filtrado. Em pacientes com **hipoparatireoidismo,** que não secretam PTH, a reabsorção do cálcio pelo túbulo renal é reduzida.

Diversos hormônios afetam direta ou indiretamente a homeostase do cálcio

O hormônio da tireoide estimula a reabsorção óssea mediada pelos osteoclastos. Os esteroides adrenais ou gonadais, particularmente o estrogênio nas mulheres e a testosterona nos homens, estimulam a função dos osteoblastos e inibem a dos osteoclastos. Eles também diminuem a excreção renal de cálcio e fosfato e aumentam a absorção de cálcio intestinal.

Os hormônios do crescimento têm efeitos anabólicos no osso, promovendo o crescimento do esqueleto. Seus efeitos são mediados por fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF-1 e IGF-2) que atuam nas células de linhagem osteoblástica.

O hormônio de crescimento aumenta a excreção urinária de cálcio e de hidroxiprolina, enquanto diminui a excreção urinária de fosfato.

Estudos recentes sugerem que o sistema nervoso central também pode estar envolvido na homeostase óssea. A leptina, uma adipocina que regula a massa do tecido adiposo e controla o apetite (Cap. 22), apresenta um efeito inibitório na formação do osso. Animais deficientes em leptina mostram um aumento da massa óssea. Entretanto, mutações na via de sinalização estimulada pela leptina não apresentam efeito na massa óssea, sugerindo que é um efeito central mediado provavelmente pelo sistema nervoso simpático.



Quadro clínico

Uma senhora de 60 anos com dor nos ossos: osteomalácia

Uma senhora de 60 anos que havia se tornado cada vez mais fraca e acamada foi encaminhada ao ambulatório de doenças metabólicas. Ela havia passado por um início gradual de dores difusas por todo o corpo, mas especialmente ao redor do quadril. Esta senhora estava com dificuldade de caminhar, fraqueza generalizada e recentemente apresentava dores intensas repentinas em suas costelas e na pelve. A radiografia detectou fraturas nas costelas. A concentração de cálcio corrigido no soro foi de 2,1 mmol/L (8,4 mg/L; faixa normal: 2,2-2,6 mmol/L, 8,8-10,4 mg/dL), a de fosfato 0,56 mmol/L (1,7 mg/dL; faixa normal: 0,7-1,4 mmol/L, 2,2-4,3 mg/dL), a atividade de fosfatase alcalina foi de 300 IU/L (faixa normal: 50-260 IU/L) e a concentração de PTH foi de 12,6 pmol/L (faixa normal: 1,1-6,9 pmol/L, 11-69 pg/mL).

Comentário

Nas formas graves da osteomalácia, as anormalidades bioquímicas são frequentemente observadas, incluindo baixos níveis de cálcio corrigido e fosfato no soro, e aumento da atividade de fosfatase alcalina e da concentração de $PTH_{(1-84)}$. Clinicamente, o paciente pode apresentar dores ósseas difusas ou dores mais específicas relacionadas a fraturas, arqueamento lateral dos membros inferiores e uma distinta marcha claudicante. Grupos étnicos de pele negra são particularmente suscetíveis em países com baixa luminosidade solar média, já que a maioria da vitamina D do corpo é formada pela ação da luz UV no 7-desidrocolesterol. Isto pode ser exacerbado por vestimentas tradicionais, e uma dieta rica em fitato (pães não fermentados) e pobre em cálcio e vitamina D.

Distúrbios do metabolismo do cálcio

A hipercalcemia é frequentemente causada por hiperparatireoidismo primário ou por malignidade

Na prática, 90% dos casos de hipercalcemia ocorrem em virtude do hiperparatireoidismo

primário ou da malignidade; o maior desafio no diagnóstico é diferenciar a malignidade de sítio primário indeterminado das causas menos comuns da hipercalcemia. Há uma grande variação individual no desenvolvimento dos sinais e sintomas da hipercalcemia (Fig. 26.5).

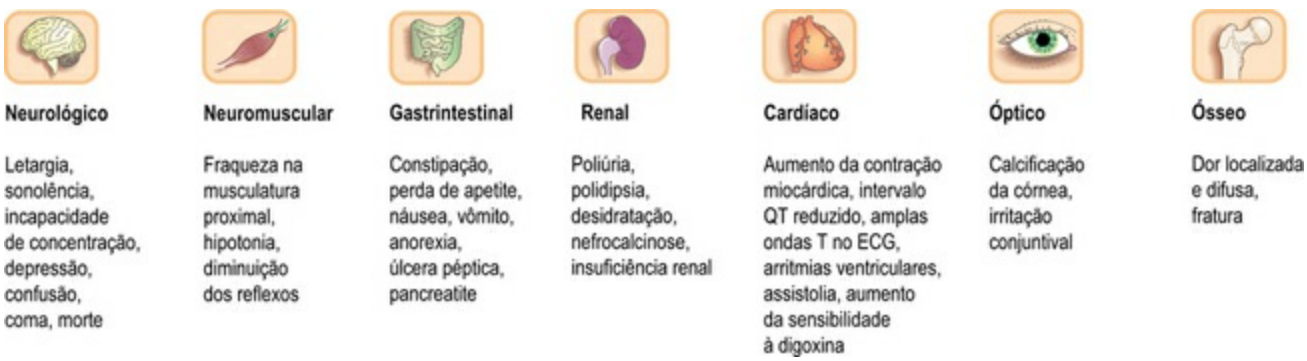


FIG. 26.5 Sinais e sintomas da hipercalcemia. Os sintomas se tornam mais aparentes à medida que a concentração sérica de cálcio aumenta.

A medição do PTH permitiu aos médicos distinguir mais facilmente o hiperparatireoidismo primário das causas de hipercalcemia de origem não paratireóidea (particularmente a maligna). Na hipercalcemia do hiperparatireoidismo primário observa-se um aumento ou uma detecção inapropriada de PTH intacto, enquanto na hipercalcemia de origem não paratireóidea os níveis de PTH se encontram frequentemente abaixo do limite de detecção do ensaio.

O histórico do paciente pode apresentar claras evidências de ingestão excessiva ou superdosagem de vitamina D, mas algumas vezes só se torna aparente após a dosagem de ergocalciferol, colecalciferol e 1,25 $(OH)_2D_3$.

O hiperparatireoidismo primário é relativamente comum

O hiperparatireodismo primário é um distúrbio endócrino relativamente comum, caracterizado pela hipercalcemia associada a aumento ou concentração inapropriados de PTH. Sua incidência na população varia de 1:500 a 1:1.000. Em 80-85% dos pacientes, encontra-se um único adenoma na glândula paratireoide, uma condição curável com a remoção bem-sucedida do adenoma. Os sinais e sintomas de paratireoidismo são descritos no Quadro da p. 347.

A hipercalcemia tende a ocorrer tardiamente no curso de doenças malignas, e é geralmente um mau sinal de prognóstico

Estudos recentes indicam que a causa mais comum para a hipercalcemia associada à malignidade (HCM) é a produção, por tumores ou suas metástases, de proteína relacionada ao paratormônio (PTHrP), que pode circular no sangue e manifestar seus efeitos no esqueleto e nos rins. A produção de PTHrP é comum nos tumores sólidos de mama, de pulmão, de rim e outros, mas é mais rara nas malignidades hematológicas, gastrintestinais, de cabeça e de pescoço. A porção aminoterminal da PTHrP possui atividade similar ao PTH, resultando em hipercalcemia, hipofosfatemia, fosfatúria,

aumento da reabsorção renal de cálcio e ativação dos osteoclastos.

Quadro de conceitos avançados

Proteína relacionada ao paratormônio (PTHrP)

A PTHrP é sintetizada em três isoformas contendo 139, 141 e 173 aminoácidos, em consequência de um *splicing* diferencial alternativo do RNA. A PTHrP apresenta homologia na sequência aminoterminal com o PTH: oito, dos primeiros 13 aminoácidos são idênticos na PTHrP e no PTH; três são idênticos dentro dos resíduos 14-34; e outros três são idênticos dentro dos resíduos 35-84. A ativação do receptor clássico de PTH ocorre através da porção aminoterminal do PTH e da PTHrP, e ambas apresentam uma estrutura secundária em α-hélice no domínio de ligação. Como resultado desta similaridade estrutural, a PTHrP apresenta muitas das ações biológicas do PTH.

O segundo tipo de hipercalcemia é resultado de um aumento da reabsorção óssea por osteoclastos estimulados pelos fatores produzidos por tumores primários ou, mais usualmente, pelas metástases. Esses fatores estimulam os osteoclastos alterando o equilíbrio RANKL/OPG. Mediadores como a PTHrP, as citocinas e os fatores de crescimento (p. ex., IL-1, TNF-α, linfotoxina, e TFG-β) estimulam os osteoclastos aumentando a reabsorção óssea significativamente. A produção de prostaglandinas, especialmente PGE_2, ocorre em diversas classes de tumores, particularmente no câncer de mama. Elas estimulam a reabsorção óssea pelos osteoclastos.

O excesso de vitamina D é tóxico

O aumento do uso terapêutico de potentes análogos da vitamina D, hidroxilados na posição 1 ou nas posições 1 e 25, fazem da toxicidade da vitamina D a terceira causa mais comum de hipercalcemia.

A hipocalcemia é comum na prática clínica

As alterações do cálcio ionizado podem ser resultado de mudanças de pH do plasma. A alcalemia (Cap. 25) aumenta a concentração de Ca^{2+} ligado a proteínas, causando a diminuição da concentração do cálcio ionizado. Os sinais clínicos da hipocalcemia são, principalmente, devido à irritabilidade neuromuscular, e são mais óbvios e graves quando o início da hipocalcemia é agudo. Em alguns casos, esta irritabilidade pode ser demonstrada pela produção de sinais clínicos específicos. O **sinal de Chvostek** é a presença de tremores na musculatura ao redor da boca (músculos periorais) em resposta à percussão do nervo facial anterior a orelha. O **sinal de Trousseau** é a típica contração da mão em resposta a uma redução do fluxo sanguíneo nos braços ocasionado pela insuflação de um aparelho de pressão. Dormência, formigamento, câimbras, tétano e até convulsões podem ocorrer. As causas da hipocalcemia podem ser divididas naquelas

associadas ao baixo $PTH_{(1-84)}$, naquelas em que o cálcio sérico diminuído causa hipertireoidismo secundário e em causas raras em que há resistência ao PTH. A causa mais comum de hipoparatireoidismo é a complicação da cirurgia de pescoço.

As síndromes de **pseudo-hipoparatireoidismo** são caracterizadas por hipocalcemia, hiperfosfatemia e concentrações aumentadas de $PTH_{(1-84)}$. O tipo clássico de pseudo-hipoparatireoidismo é devido à resistência do órgão ao PTH. Isto ocorre em função de um defeito genético, resultando na síntese de uma subunidade regulatória anormal da proteína G. A confirmação do diagnóstico é feita pela observação dos níveis de cAMP no plasma e na urina após a infusão de PTH. As principais causas de hipocalcemia são listadas na Tabela 26.1.

Tabela 26.1

Causas da hipocalcemia

Hipoparatireoide	Não paratireóidea	Resistência ao PTH
Pós-operatório	Deficiência de vitamina D	Pseudo- hipoparatireoidismo
Idiopática	Má absorção	Hipomagnesemia
Irradiação cervical	Doença renal	
Terapia anticonvulsivante	Resistência à vitamina D	
	Hipofosfatemia	

A hipocalcemia pode dever-se a anormalidades no metabolismo da vitamina D

Deficiência, distúrbios adquiridos ou hereditários de seu metabolismo e resistência à vitamina D podem ocorrer. As causas mais comuns da carência de vitamina D são:

Baixa exposição à luz solar: esta é comum em pessoas idosas institucionalizadas e imigrantes na Europa ocidental, vindos do Oriente Médio ou do subcontinente indiano, que vestem roupas tradicionais.

Ingestão de uma dieta pobre em vitamina D: isto é, dietas como a dos vegetarianos restritos, que possuem uma quantidade inadequada desta vitamina que, a longo prazo, pode resultar em uma carência.

Má absorção de vitamina D causada por doença celíaca, doença de Crohn, insuficiência pancreática, secreção inadequada de sal biliar e diarreia (*sprue*) não tropical.

Doenças no fígado (deficiência de 25-hidroxilação) e insuficiência renal (deficiência de 1α-hidroxilase).

Doença metabólica óssea

A osteoporose é uma doença óssea comum relacionada à idade

A osteoporose é definida como uma redução significativa da densidade mineral óssea em relação aos índices de referência com o sexo e a idade, o que leva ao aumento da

suscetibilidade a fraturas. Setenta milhões de pessoas em todo o mundo correm o risco de desenvolverem osteoporose. A osteoporose está associada ao envelhecimento. A densidade óssea diminui a partir do seu pico máximo, alcançado por volta dos 30 anos de idade nos homens e nas mulheres, e a taxa de perda óssea é acelerada nas mulheres após a perda da secreção de estrogênio na menopausa. A perda óssea progressiva é um resultado do desacoplamento do *turnover* ósseo por um período de tempo muito prolongado, com um relativo **aumento da reabsorção** ou **decréscimo da absorção óssea.** Vários fatores contribuem para um aumento do risco de osteoporose (Fig. 26.6).

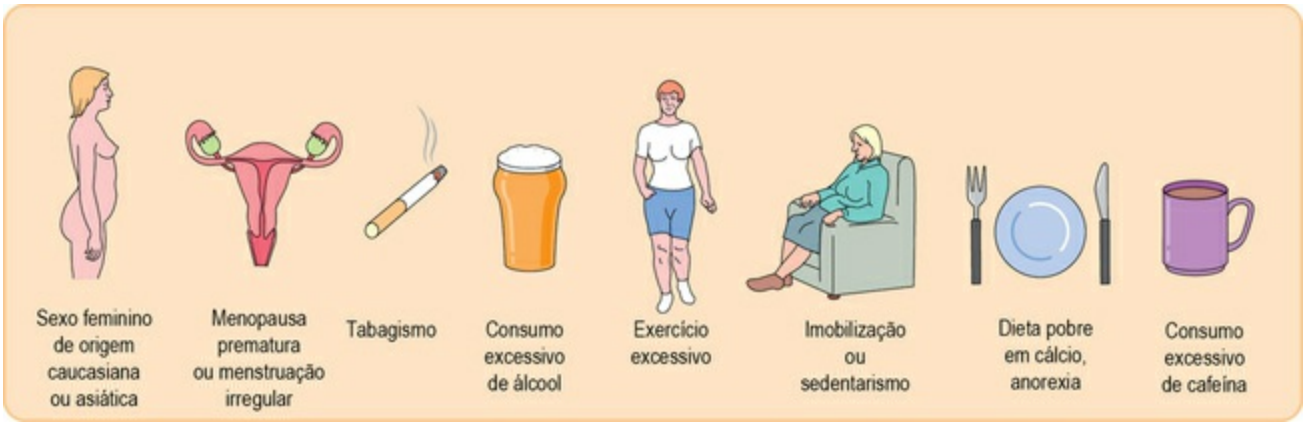


FIG. 26.6 Fatores de risco e causas secundárias da osteoporose.

A doença de Paget dos ossos é caracterizada por áreas de *turnover* ósseo acelerado

Os osteoclastos na doença de Paget são grandes, numerosos e multinucleados; suas atividades estão associadas ao aumento do número e da atividade dos osteoblastos. Uma anormalidade bioquímica comum a esta doença é a alta atividade de fosfatase alcalina no soro, a qual reflete aumento da atividade dos osteoblastos. A intensa quebra do colágeno pelos osteoclastos resulta em altas concentrações de hidroxiprolina, piridinolinas e telopeptídios do colágeno no soro e na urina. Os bifosfonatos (Fig. 26.7) apresentam uma atividade antiosteoclástica significativa, e são os fármacos de primeira escolha para o tratamento da doença de Paget.

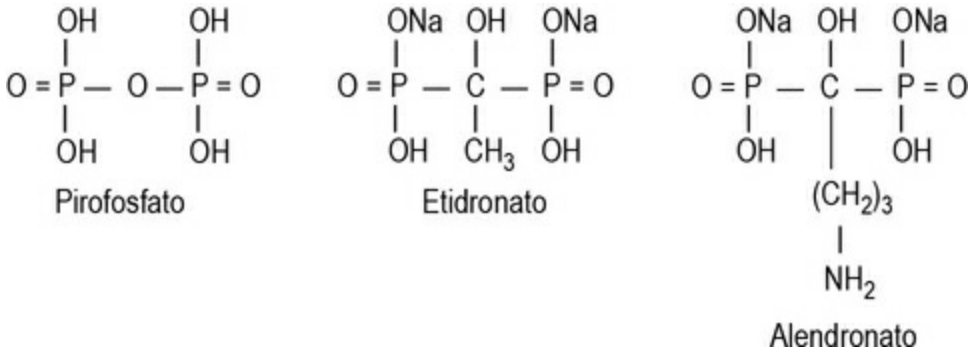


FIG. 26.7 Fórmulas estruturais do pirofosfato e dos bifosfonatos.
As ligações P-C-P dos bifosfonatos podem resistir à clivagem enzimática, e a potência desses fármacos é determinada pela sequência química ligada à molécula de carbono.

Quadro clínico

Uma senhora de 62 anos hospitalizada após uma queda: osteoporose

Uma senhora de 62 anos foi admitida no hospital após uma queda no banheiro com uma intensa dor nas costas que surgiu repentinamente entre as escápulas. A radiografia detectou fraturas em cunha no corpo de duas vértebras torácicas com redução da densidade óssea. A avaliação da densidade óssea (absortometria de energia dupla de raios-x [DEXA]) mostrou uma redução intensa da densidade óssea do fêmur e da espinha dorsal. Essa senhora entrou na menopausa após uma cirurgia de histerectomia aos 41 anos, no entanto, tinha sido incapaz de tolerar a terapia de reposição hormonal (HRT). As investigações bioquímicas estavam todas dentro dos limites normais.

Comentário

Os sintomas da osteoporose desenvolvem-se em um estágio tardio da doença e são geralmente causados pela presença de fratura(s). As fraturas no quadril, nas vértebras e no punho são comuns em pacientes com osteoporose.

Resumo

- O osso é um tecido metabolicamente ativo que passa por remodelamento constante.
- As principais células envolvidas no processo de remodelamento são os osteoclastos e os osteoblastos.
- O metabolismo ósseo está intimamente correlacionado com o metabolismo do cálcio, o qual também envolve o intestino e o rim.
- O equilíbrio do cálcio é regulado hormonalmente pelo paratormônio, pelos metabólitos da vitamina D e pela calcitonina.
- A medição do cálcio no soro é um importante teste em laboratórios clínicos, porque tanto a hipercalcemia quanto a hipocalcemia levam a sintomas clínicos.
- A hipocalcemia é comum na prática clínica.
- As principais causas da hipercalcemia são o hiperparatireoidismo primário, malignidade e o excesso de vitamina D.
- A osteoporose é um grave problema de saúde e é caracterizada pela diminuição da densidade óssea, ocasionando fraturas.

Questões para aprendizagem

1. Descreva o sistema de sinalização de RANK-RANKL nos osteoclastos.
2. Discuta os fatores que regulam o funcionamento dos osteoblastos.
3. Descreva as formas presentes do cálcio no plasma. Qual delas é biologicamente ativa?
4. Discuta os mecanismos de *feedback* que mantêm a concentração de cálcio no plasma.

Leituras sugeridas

Boyle, W. J., Simonet, W. S., Lacey, D. L. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003; 423:337–341.

Buckley, K. A., Fraser, W. D. Receptor activator for nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegrin: regulators of bone physiology and immune responses/potential therapeutic agents and biochemical markers. *Ann Clin Biochem*. 2002; 39:551–556.

Datta, H. K., Ng, W. F., Walker, J. A., et al. The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol*. 2008; 61:577–587.

Fraser, W. D. Paget's disease of bone. *CPD Rheumatology*. 2001; 2:8–13.

Fraser, W. D. Hyperparathyroidism. *Lancet*. 2009; 374:145–158.

Harada, S., Rodan, G. A. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature*. 2003; 423:349–355.

Rachner, T. D., Khosla, S., Hofbauer, L. Osteoporosis: now and the future. *Lancet*. 2011; 377:1276–1287.

Richards, J. B., Rivadeneira, F., Pastinen, T. M., et al. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study. *Lancet*. 2008; 371:1505–1512.

Wharton, B., Bishop, N. Rickets. *Lancet*. 2003; 362:1389–1400.

Sites

Peacock, M., Calcium metabolism in health and disease. *CJASN*. 2010;5(Suppl 1):523–530. http://cjasn.asnjournals.org/content/5/Supplement_1/S23.long

CAPÍTULO 27

Carboidratos Complexos: Glicoproteínas

†Alan D. Elbein and Koichi Honke

Objetivos

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever as estruturas gerais dos oligossacarídios (glicanos) em vários tipos de glicoproteínas.
- Escrever a sequência de reações envolvidas na biossíntese e processamento de *N*-glicanos para produzir os vários tipos de cadeias de oligossacarídios.
- Descrever o papel dos *N*-glicanos no enovelamento e estabilidade das proteínas, e reconhecimento célula-célula.
- Explicar a importância dos *O*-glicanos na função da mucina.
- Descrever como cada monossacarídio, envolvido na biossíntese de *N*-glicanos e *O*-glicanos, é sintetizado da glicose e ativado para a síntese de glicoconjugados.
- Distinguir lectinas de outros tipos de proteínas e descrever seu papel na fisiologia e patologia.
- Descrever diversas doenças que estão associadas a deficiências em enzimas envolvidas na síntese, modificação ou degradação de carboidratos complexos.

Introdução

Os glicoconjugados incluem glicoproteínas, proteoglicanos e glicolipídios

Muitas proteínas de mamíferos são glicoproteínas, isto é, contêm açúcares covalentemente ligados a aminoácidos específicos em sua estrutura. Existem dois tipos principais de proteínas que contêm açúcares que ocorrem em células animais, geralmente conhecidos como glicoproteínas e proteoglicanos. Juntamente com os glicolipídios, os quais são apresentados no próximo capítulo, todos esses compostos fazem parte de um grupo de macromoléculas que contêm açúcares chamado

glicoconjugado.

As glicoproteínas (Fig. 27.1A) possuem cadeias glicadas curtas: podem ter até 20 açúcares, mas geralmente contêm entre três e 15. Esses oligossacarídios são altamente ramificados, não têm uma unidade de repetição, e geralmente contêm açúcares aminados (*N*-acetilglicosamina ou *N*-acetilgalactosamina), açúcares neutros (d-galactose, d-manose, l-fucose) e o açúcar ácido: ácido siálico (ácido *N*-acetilneurâmico). Em geral, as glicoproteínas não contêm ácidos urônicos, açúcares ácidos que constituem importante parte dos proteoglicanos. As glicoproteínas geralmente contêm quantidades muito menores de carboidratos do que de proteínas, tipicamente de pequenos percentuais de carboidratos, a 10%-15% de açúcar por peso.

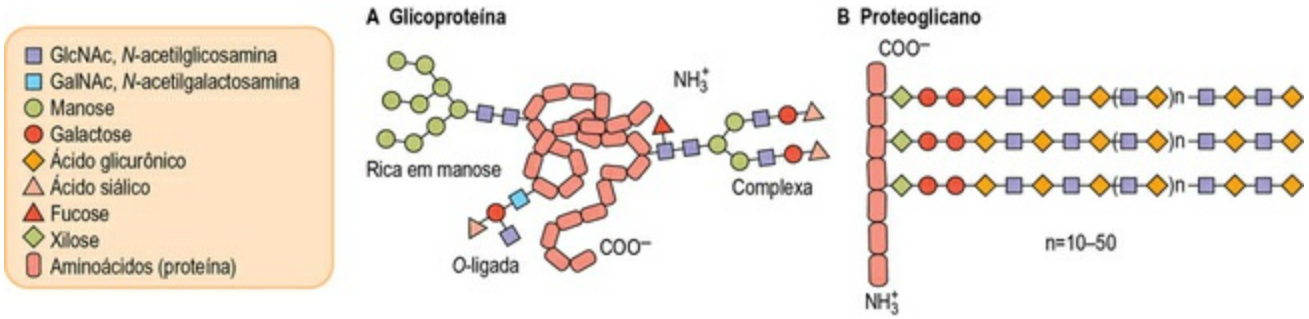


FIG. 27.1 Modelo generalizado da estrutura de glicoproteínas e proteoglicanos.

Os proteoglicanos (Fig. 27.1B e Cap. 29) contêm cerca de 50-60% de carboidratos. Nessas moléculas, as cadeias de açúcares são longas, polímeros não ramificados que podem conter centenas de monossacarídios. Essas cadeias de sacarídios possuem uma unidade dissacarídica de repetição, em geral composta de um ácido urônico e um açúcar aminado.

A maioria das proteínas de membrana da superfície celular, que funcionam como receptores para hormônios ou participam de outros processos importantes associados à membrana, como as interações célula-célula, são glicoproteínas. Muitas das proteínas de membrana do retículo endoplasmático ou aparelho de Golgi, bem como as proteínas que são secretadas pelas células, incluindo proteínas mucosas e séricas, também são glicoproteínas. De fato, a glicosilação é a principal modificação enzimática das proteínas no corpo. A adição de açúcares a uma proteína pode ocorrer ao mesmo tempo e na mesma localização enquanto a síntese de proteínas está ocorrendo no retículo endoplasmático, isto é, cotraducionalmente, ou após o término da síntese proteica e após a proteína ter sido transportada para o aparelho de Golgi, ou seja, pós-traducionalmente. As funções das cadeias de carboidratos das glicoproteínas resultantes são diversas (Tabela 27.1).

Tabela 27.1

Função dos carboidratos nas glicoproteínas

- Auxilia o enovelamento da proteína na conformação correta
- Aumenta a solubilidade da proteína
- Estabiliza a proteína contra desnaturação
- Protege a proteína da degradação proteolítica
- Direciona a proteína para localizações subcelulares específicas
- Serve como sinal de reconhecimento para proteínas ligantes de carboidratos (lectinas)

Estruturas e Ligações

Os açúcares são unidos a aminoácidos específicos nas proteínas

Os açúcares podem ser ligados às proteínas por ligações **N-glicosídicas** ou **O-glicosídicas.** Os oligossacarídios *N*-ligados (*N*-glicanos) são largamente distribuídos na natureza e são característicos de proteínas de membrana e secretadas. A ligação desses oligossacarídios à proteína envolve uma ligação glicosilamina entre um resíduo de *N*-acetilglicosamina (GlclNAc) e o nitrogênio amida de um resíduo de asparagina (Fig. 27.2A). A asparagina, que serve como um aceptor deste oligossacarídio, deve estar na **sequência consenso** Asn-X-Ser (Thr) para ser reconhecida como aceptor pela enzima que transfere o oligossacarídio (a seguir). Entretanto, nem todos os resíduos de asparagina, mesmo aqueles da sequência consenso tornam-se glicosilados, indicando que outros fatores como a conformação ou outras propriedades da proteína podem estar envolvidos.

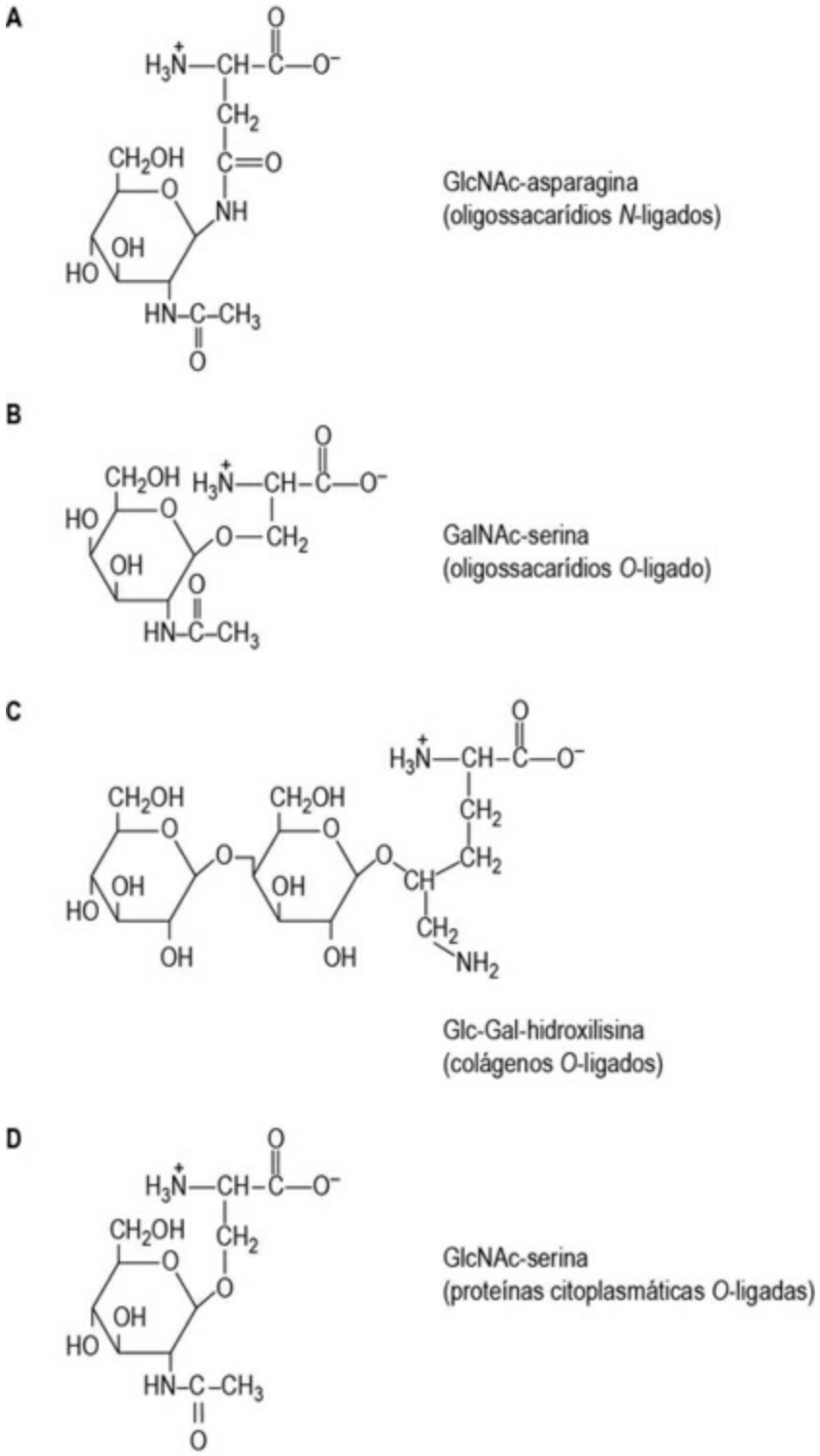


FIG. 27.2 Várias ligações de açúcares a aminoácidos nas glicoproteínas. GlcNAc, *N*-acetilglicosamina.

Os oligossacarídios *O*-ligados (*O*-glicanos) são os mais encontrados nas proteínas de fluidos mucosos, mas também ocorrem frequentemente nas mesmas proteínas de membrana e secretadas que contêm os *N*-glicanos. Os *O*-glicanos contêm tipicamente três ou mais açúcares em cadeia linear ou ramificada, unidos à proteína por uma ligação glicosídica entre um resíduo de *N*-acetilgalactosamina (GalNAc), e um grupamento hidroxil de um resíduo de serina ou treonina da proteína (Fig. 27.2B; e Fig. 27.4). Não parece haver uma sequência consenso de aminoácidos para glicosilação *O*-ligada, desta forma, não se sabe como algumas serinas (ou treoninas) tornam-se glicosiladas e outras não.

Um dissacarídio glicosil-galactose está frequentemente ligado ao grupo hidroxila de resíduos de hidroxilisina nas proteínas fibrosas, como o colágeno (Fig. 27.2C). A **hidroxilisina** é um aminoácido incomum, encontrado somente em colágenos e proteínas com domínios colagenosos. A hidroxilisina não é incorporada diretamente nas proteínas, mas é produzida por hidroxilação pós-traducional dos resíduos de lisina. A lisina hidroxilase requer a vitamina C como um cofator, o que explica porque a vitamina C é frequentemente usada para acelerar a cicatrização de lesões. O colágeno é inicialmente sintetizado na célula como uma forma precursora chamada pró-colágeno. Os pró-colágenos geralmente são sintetizados como *N*-glicanos, mas o oligossacarídio *N*-ligado é removido como parte daquele peptídio que é clivado do pró-colágeno durante sua maturação para colágeno. Somente os dissacarídios *O*-ligados permanecem na molécula de colágeno madura. Os colágenos menos glicosilados tendem a formar estruturas ordenadas fibrosas, assim como ocorre nos tendões, enquanto os colágenos abundantemente glicosilados são encontrados em estruturas em rede, como as membranas basais da parede vascular e do glomérulo renal (Cap. 29).

Um único GlcNAc é ligado ao grupo hidroxila de resíduos de serina e treonina em diversas proteínas citoplasmáticas e nucleares (Fig. 27.2D). Esse GlcNAc *O*-ligado (*O*-GlcNAc) é ligado a resíduos de serina e treonina específicos que se tornam fosforilados por proteínas cinases durante estimulação hormonal ou outros eventos de sinalização. A enzima que adiciona o GlcNAc é largamente distribuída, mas como é controlada ainda não está claro. Existe uma segunda enzima que remove o GlcNAc dos resíduos de serina e treonina, semelhante ao contrastante papel regulatório das proteínas cinases e fosfatases. A modificação GlcNAc **(*O*-GlcNAcilação)** pode representar um mecanismo que permite às células bloquearem a fosforilação de resíduos de serina e treonina específicos em proteínas selecionadas, enquanto permitem que outros continuem a ser fosforilados. Em seguida, a GlcNAc pode ser removida em condições apropriadas para possibilitar a fosforilação. O substrato doador da *O*-GlcNAcilação é a UDP-GlcNAc (ver abaixo), que deriva da glicose. A *O*-GlcNAcilação depende do nível intracelular de UDP-GlcNAc, que se correlaciona com a concentração extracelular de glicose. A *O*-GlcNAcilação de proteínas envolvidas na via de sinalização da insulina ocasiona resistência à insulina no músculo esquelético, tecido adiposo e células β pancreáticas, o que causa diabetes tipo 2. A *O*-GlcNAcilação também regula fatores de transcrição, bem como o proteassoma, que está envolvido no *turnover* proteico (Cap. 34).

Uma nova classe de glicanas *O*-ligadas, na qual a manose está ligada a resíduos de serina ou treonina, é encontrada no músculo e na proteína distroglicano, específica dos nervos. Uma glicana *O*-manose típica consiste em GlcNAc, galactose e ácido siálico, que estão ligados à manose central nesta ordem. As glicanas *O*-manose funcionam como ligações covalentes entre o citoesqueleto intracelular e a matriz extracelular, para manter a função dos miócitos. Na verdade, a deficiência na biossíntese de glicanas *O*-manose causa distrofia muscular.

Outro aminoácido que pode servir como local para glicosilação é a tirosina. O único exemplo dessa ligação é na proteína glicogenina, encontrada no centro do glicogênio (Cap. 13). A **glicogenina** é uma proteína autoglicosilante que inicialmente liga uma

glicose ao grupo hidroxila de um dos seus resíduos de tirosina. A proteína então adiciona várias outras glicoses à glicose ligada à proteína para fazer um oligossacarídio que serve como aceptor para a glicogênio sintase.

N-glicanos têm "muita manose" ou estruturas "complexas" construídas sobre uma estrutura central comum

Embora exista um grande número de diferentes estruturas de carboidratos produzidas por células vivas, a maioria dos oligossacarídios nos glicoconjugados tem muitos açúcares e ligações glicosídicas em comum. Todos os *N*-glicanos têm cadeias de oligossacarídios que são estruturas ramificadas tendo um centro comum de três resíduos de manose e dois resíduos de GlcNAc (Fig. 27.3A e B), mas diferem consideravelmente além da região central, podendo formar cadeias do tipo rica em manose ou complexas. A razão para essa similaridade na estrutura é que o tipo de oligossacarídio *N*-ligado tipo rico em manose é o precursor biossintético para todos os outros *N*-glicanos. Como indicado a seguir (Fig. 27.11), o oligossacarídio é inicialmente formado em um carreador lipídico no retículo endoplasmático como uma estrutura rica em manose, e então é transferido para a proteína. Ele pode permanecer como uma estrutura rica em manose, especialmente em organismos inferiores, mas nos animais os oligossacarídios sofrem uma série de processamentos no retículo endoplasmático e no aparelho de Golgi que envolvem a remoção de algumas manoses e a adição de outros açúcares. Como resultado, além da região central, os oligossacarídios dão origem a uma variedade de estruturas conhecidas como ricas em manose (Fig. 27.3A), e cadeias complexas (Fig. 27.3B).

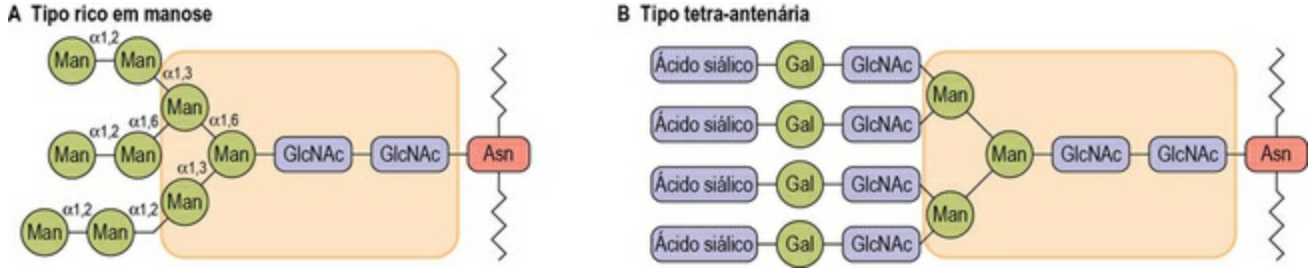


FIG. 27.3 Estruturas típicas ricas em manose e complexas, oligossacarídios *N*-ligados. A estrutura central (área sombreada) é comum a ambas as estruturas. Asn, asparagina; Gal, galactose; GlcNAc, *N*-acetilglicosamina; Man, manose.

Os oligossacarídios complexos são assim denominados devido à sua composição de açúcar mais complexa, incluindo galactose, ácido siálico e L-fucose. As cadeias complexas têm sequências trissacarídicas terminais compostas de ácido siálico-galactose-GlcNAc presas a cada manose do oligossacarídio ramificado central (Fig. 27.3A). A L-fucose pode também ser encontrada em ligação ao núcleo GlcNAc (Fig. 27.1A), à galactose terminal (Fig. 28.12) ou à penúltima GlcNAc (Fig. 27.9). Semelhante ao ácido siálico, a fucose é geralmente um açúcar terminal nos oligossacarídios; o que significa que nenhum outro açúcar está ligado a ela. Alguns dos oligossacarídios complexos têm duas sequências de trissacarídios, ligadas a cada manose do oligossacarídio ramificado central sendo, portanto, chamados de cadeias complexas biantenárias; enquanto que outros têm três

(triantenárias) ou quatro (tetra-antenárias) das estruturas trissacarídicas (Fig. 27.3B). Mais de cem estruturas diferentes de oligossacarídios complexos foram identificadas em várias proteínas de superfície celular, proporcionando grande diversidade (micro-heterogeneidade) como mediadores de reconhecimento celular e eventos de sinalização química.

Estruturas gerais das glicoproteínas

Uma glicoproteína pode ter uma única cadeia de *N*-glicano ou pode ter vários desse tipo de oligossacarídio. Além disso, os *N*-glicanos podem todos ter estruturas idênticas ou podem ser bastante diferentes. Por exemplo, as glicoproteínas da capa do vírus influenza, hemaglutinina e neuraminidase, são ambas glicoproteínas as quais geralmente têm sete cadeias de *N*-glicanos, das quais cinco são cadeias complexas biantenárias e duas são estruturas ricas em manose. Assim, é comum encontrar várias estruturas relacionadas em uma única glicoproteína e, de fato, múltiplas estruturas diferentes podem ser encontradas em um único local na glicoproteína. A **micro-heterogeneidade** das estruturas oligossacarídicas resulta do processamento incompleto de algumas cadeias durante sua biossíntese (Fig. 27.12). Como resultado, alguns dos oligossacarídios em uma glicoproteína podem ser cadeias complexas completas enquanto outros podem ter sido processados somente parcialmente. Tal diversidade no processamento das *N*-glicanas é controlada por muitos fatores. A estrutura proteica próxima do sítio de *N*-glicosilação pode ter alguma influência no processamento. Em geral, as *N*-glicanas expostas à superfície de uma proteína enrolada são vulneráveis às enzimas processadoras, enquanto aquelas protegidas na estrutura da proteína estão inacessíveis às enzimas.

Muitas glicoproteínas *N*-ligadas também contêm *O*-glicanos do tipo mostrado na Figura 27.4. O número de *O*-glicanos varia consideravelmente dependendo da proteína e sua função. Por exemplo, o receptor da lipoproteína de baixa densidade (LDL) está presente na membrana plasmática de células musculares lisas e fibroblastos, e funciona para ligar e endocitar o LDL circulante, como fonte de esterol dietético. O receptor de LDL tem dois *N*-glicanos localizados próximo ao domínio ligante de LDL, e um conjunto de *O*-glicanos próximo à região que atravessa a membrana. Como mostrado na Figura 27.5, esse receptor tem uma região de aminoácidos hidrofóbicos que atravessa a membrana, uma região estendida de aminoácidos no lado externo da membrana plasmática que contém um conjunto de *O*-glicanos, e um domínio funcional que está envolvido na ligação ao LDL (Cap. 18). Embora os dois *N*-glicanos estejam perto do domínio funcional, eles não atuam na ligação ao LDL. Em vez disso, sua função parece ser ajudar a proteína a se dobrar em sua conformação apropriada no retículo endoplasmático de modo que possa ser translocada para o aparelho de Golgi. Acredita-se que a função dos *O*-glicanos carregados negativamente, contendo um ácido siálico cada um, seja a de manter a proteína em um estado estendido e impedir que ela volte a se dobrar.

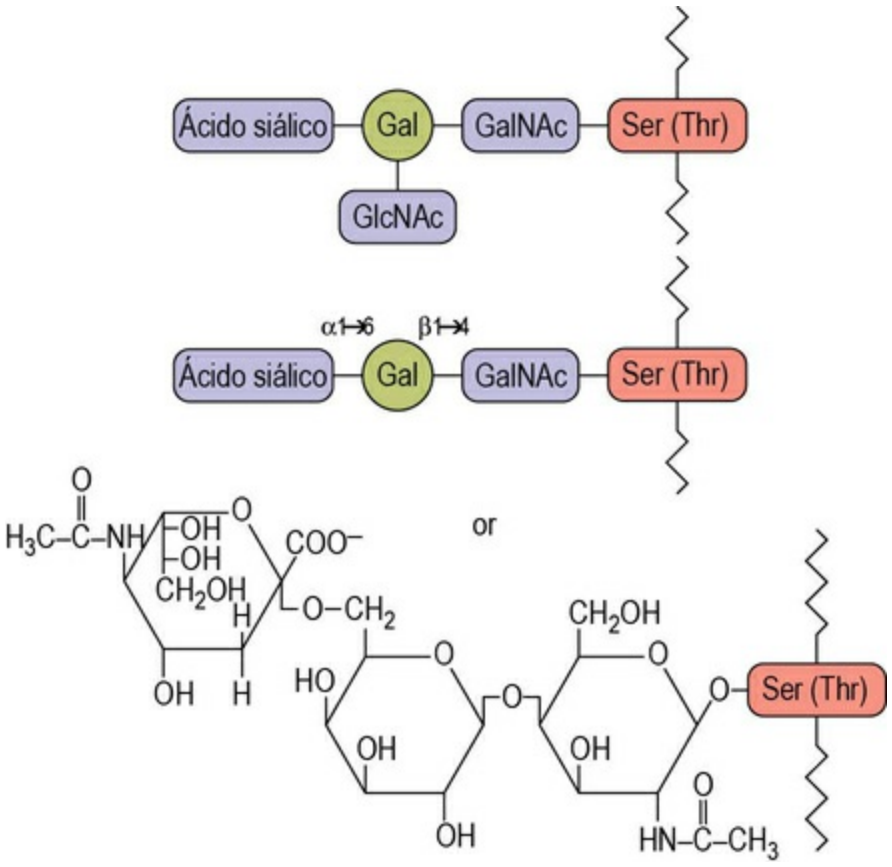


FIG. 27.4 Estruturas típicas de oligossacarídios *O*-ligados.

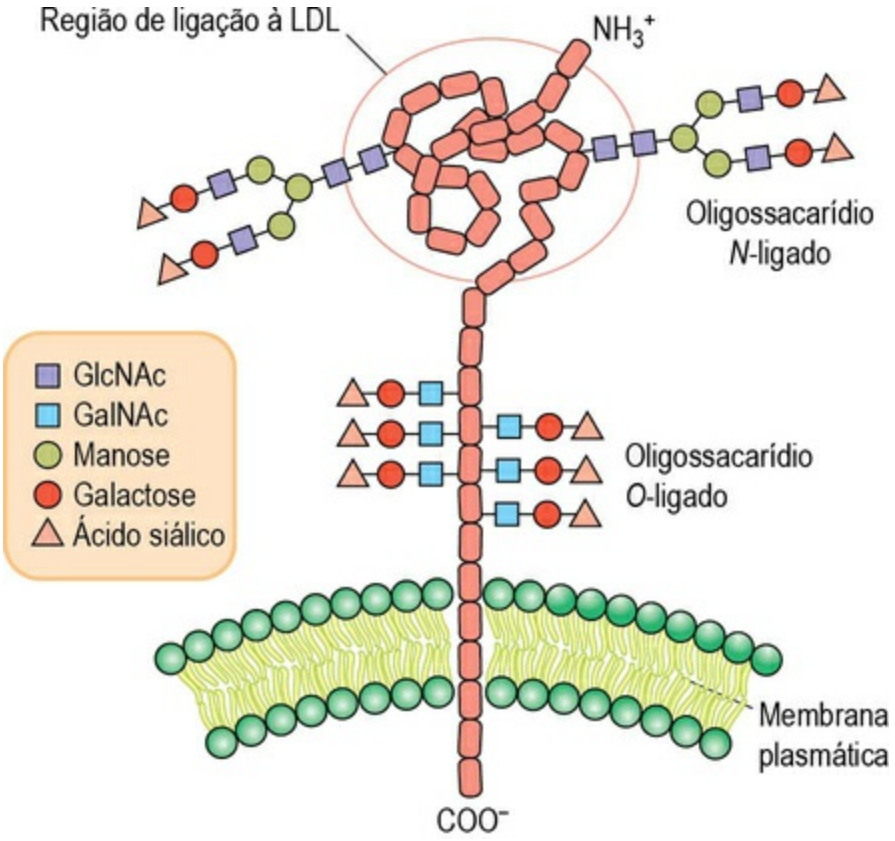


FIG. 27.5 Modelo do receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL).
(Veja também o Cap. 18 e compare com a Fig. 18.2).

Relação função-estrutura nas glicoproteínas mucinas

As mucinas são glicoproteínas secretadas pelas células epiteliais de revestimento dos tratos respiratório, gastrintestinal e genitourinário. Essas proteínas são muito grandes em tamanho, com subunidades de peso molecular superior a um milhão de dáltons, e tendo quase 80% do seu peso de carboidratos. **As mucinas são desenhadas unicamente para sua função,** com cerca de um terço de aminoácidos sendo serinas ou treoninas, e a maioria desses sendo modificados com oligossacarídios *O*-glicanos. Devido a maioria dos oligossacarídios carregarem um ácido siálico negativamente carregado e essas cargas negativas estarem bem próximas, elas repelem umas às outras e impedem a proteína de se enovelar, fazendo que ela permaneça em seu estado estendido. Assim, a solução de proteína é altamente viscosa, formando uma barreira protetora na superfície epitelial, promovendo lubrificação entre as superfícies e facilitando os processos de transporte, como o movimento do alimento através do sistema gastrintestinal. Existe uma ampla variedade de complexas estruturas oligossacarídicas lineares e ramificadas nas mucinas, incluindo antígenos de grupos sanguíneos (Cap. 28). Alguns oligossacarídios participam da interação e ligação a várias superfícies de células bacterianas. Essa propriedade pode ter um papel significante no sequestro e eliminação de bactérias, limitando sua colonização e infecção.



Quadro de conceitos avançados

A estrutura dos oligossacarídios *N*-glicanos depende das enzimas que a célula possui

A estrutura final da cadeia de *N*-glicanos de uma dada glicoproteína não é codificada nos genes destas proteínas, mas depende do conteúdo de enzimas da célula que faz aqueles oligossacarídios. Todas as células parecem ter as enzimas necessárias para produzir o sacarídio ligado ao lipídio precursor das cadeias *N*-ligadas ricas em manose, e podem, portanto, glicosilar qualquer proteína de membrana que tenha uma asparagina apropriada na sequência e conformação proteica correta. Entretanto, as glicosiltransferases e glicosidases envolvidas em processar os oligossacarídios à sua estrutura complexa final não são largamente distribuídas, e uma dada glicosiltransferase pode estar presente em um tipo celular, mas não em outro. Por exemplo, um tipo celular poderá possuir a GlcNAc transferase (GlcNAc T-IV ou V) necessária à ligação de uma segunda GlcNAc nas α-manoses 2-ligadas para produzir uma cadeia com três ou quatro ramificações, enquanto outro tipo celular poderá não ter essas GlcNAc transferases. Tal célula fará somente cadeias biantenárias. Vírus envelopados, tais como o vírus da influenza ou o HIV, são exemplos desse fenômeno, desde que as estruturas de seus *N*-glicanos reflitam a célula na qual eles crescem; os vírus usam a maquinaria celular para fazerem todas as suas estruturas, e, portanto, suas glicoproteínas terão as estruturas de carboidratos características das células infectadas. Para os vírus, isso é vantajoso, visto que suas proteínas não serão

reconhecidas como proteínas estranhas e escaparão da vigilância do sistema imune. Isso permite que vírus se liguem aos receptores da célula hospedeira e se fusionem com as membranas da mesma célula hospedeira, interagindo com as lectinas do hospedeiro. Na indústria de biotecnologia, isso significa que, embora uma dada proteína tenha sequências de aminoácidos idênticas independentemente do tipo celular, ela terá diferentes estruturas de oligossacarídios, dependendo da célula na qual ela for expressa. Essas diferenças nas estruturas dos carboidratos podem afetar a conformação e as propriedades funcionais da proteína e limitar seu uso em terapias de reposição de proteínas ou enzimas. De fato, muitas células usadas para expressar proteínas "humanas" são construídas por bioengenharia para conterem o conjunto de enzimas necessárias para glicosilar apropriadamente a proteína-alvo.

Interconversões dos açúcares da dieta

Células podem usar a glicose para fazer todos os açúcares de que elas precisam

Os humanos têm uma necessidade dietética para alguns ácidos graxos e aminoácidos essenciais, e vitaminas (Cap. 11), mas todos os açúcares que eles necessitam para fazer glicoconjugados podem ser sintetizados do açúcar sanguíneo, isto é, D-glicose. A Figura 27.6 apresenta uma visão geral das sequências de reações envolvidas na interconversão de açúcares em células de mamíferos. Todas essas reações de interconversões de açúcares envolvem açúcares fosfatos ou açúcares nucleotídios.

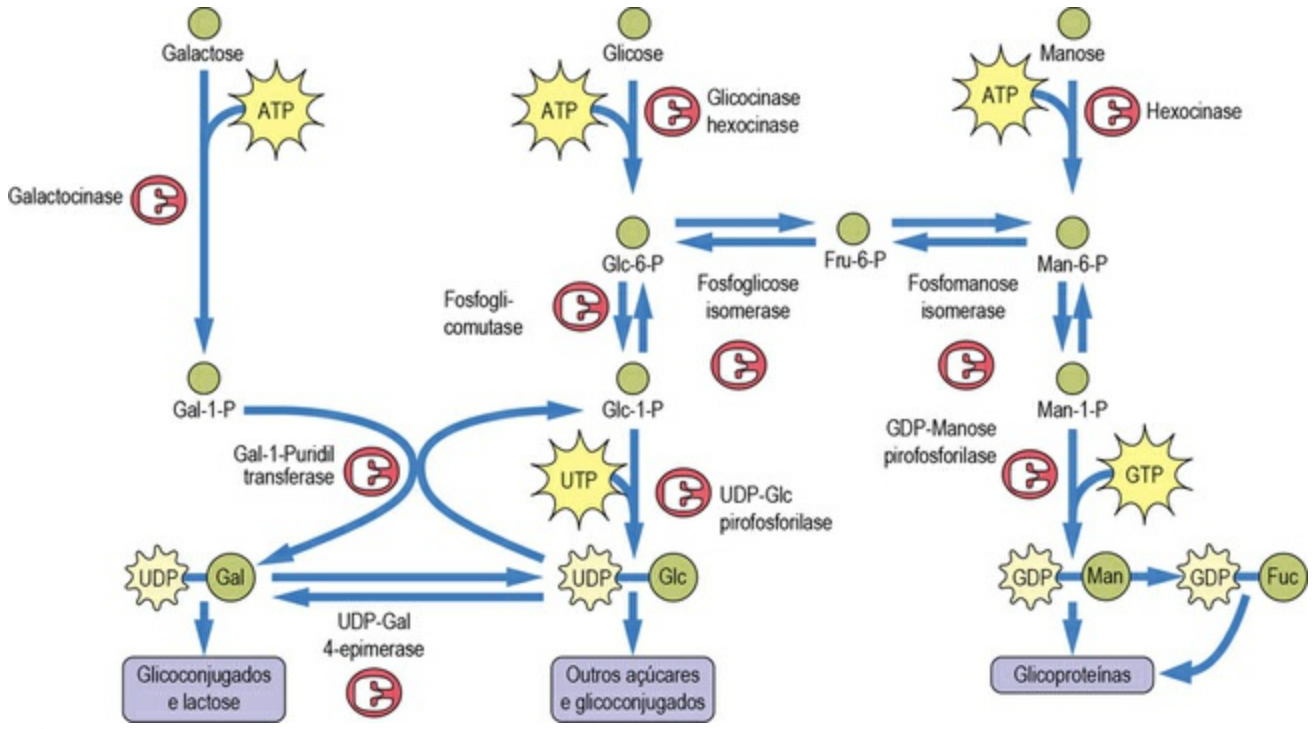


FIG. 27.6 Interconversões de glicose, manose, galactose e seus açúcares nucleotídios.
Fuc, fucose; Gal-1-P, galactose-1-fosfato; Glc-1-P, glicose-1-fosfato; Man-1-P, manose-1-fosfato.

Formação de galactose, manose e fucose a partir da glicose

A glicose é fosforilada pela hexocinase (ou glicocinase no fígado) assim que entra na célula. A glicose-6-fosfato (Glc-6-P) pode então ser convertida por uma mutase (fosfoglicomutase) para formar Glc-1-P, a qual reage com uridina 5′-trifosfato (UTP) para formar UDP-Glc, catalisado pela enzima UDP-Glc pirofosforilase (Fig. 27.6). Essa enzima é uma pirofosforilase, denominada para uma reação reversa na qual o fosfato da Glc-1-P atua clivando a ligação pirofosfato da UTP para formar UDP-Glc e pirofosfato (PPi); a clivagem da ligação de alta energia do PPi pela pirofosfatase promove o impulso para a reação. Essa é a mesma via usada no fígado e no músculo para incorporação da glicose em glicogênio. A UDP-Glc é epimerizada à UDP-galactose (UDP-Gal) pela UDP-Gal 4-epimerase, promovendo UDP-Gal para síntese de glicoconjugados.

A Glc-6-P também pode ser convertida em frutose-6-fosfato (Fru-6-P) pela enzima glicolítica fosfoglicose isomerase, e a Fru-6-P pode ser isomerizada à manose-6-fosfato (Man-6-P) pela fosfomanose isomerase. A Man-6-P é então convertida pela mutase (fosfomanose mutase) em Man-1-P, a qual condensa com o GTP para formar GDP-Man. A GDP-Man é a forma da manose que é usada na formação de oligossacarídios *N*-ligados e é também a precursora para a formação de fucose ativada, GDP-L-fucose. A manose está presente em nossa dieta em pequenas quantidades, mas ela não é um componente essencial da dieta, uma vez que pode ser rapidamente produzida a partir da glicose. Entretanto, a manose dietética pode ser fosforilada pela hexocinase à Man-6-P, e então entrar no metabolismo por meio da fosfomanose isomerase.

Metabolismo da galactose

Embora as células animais normais possam fazer toda a galactose de que precisam a partir da glicose, a galactose ainda é um importante componente de nossa dieta porque é um dos açúcares que compõem o dissacarídio do leite, a lactose. A via do metabolismo da galactose requer três enzimas (Fig. 27.6). A galactose da dieta é transportada para o fígado onde é fosforilada por uma cinase específica, a galactocinase, que liga um fosfato ao grupo hidroxila no carbono-1, em vez do carbono-6, para formar galactose-1-fosfato (Gal-1-P). Os humanos são deficientes em UDP-Gal pirofosforilase, de modo que a conversão da Gal-1-P em Glc-1-P envolve a participação de um açúcar nucleotídio, UDP-Glc. A enzima Gal-1-P uridiltransferase catalisa uma troca entre UDP-Glc e Gal-1-P para formar UDP-Gal e Glc-1-P (Fig. 27.6). A UDP-Gal é usada para a síntese de glicoconjugados, enquanto a Glc-1-P pode ser convertida em Glc-6-P pela fosfoglicomutase, e, assim, a molécula de galactose original entra na glicólise.

A UDP-Glc está presente nas células somente em concentrações micromolares, assim a sua disponibildade para o metabolismo da galactose poderia ser rapidamente exaurida se não fosse pela presença de uma terceira enzima, a UDP-Gal-4-epimerase. Essa enzima catalisa o equilíbrio entre UDP-Glc e UDP-Gal, promovendo uma síntese constante de UDP-Glc durante o metabolismo da galactose. As reações catalisadas pela (1)

galactocinase; (2) **Gal-1-P-uridiltransferase;** e (3) **UDP-Gal-4-epimerase** estão resumidas a seguir, ilustrando as vias indiretas pelas quais a galactose passa a ser incorporada às vias metabólicas.

$$(1)\ \text{Gal} + \text{ATP} \rightarrow \text{Gal} - 1 - \text{P} + \text{ADP}$$
$$(2)\ \text{Gal} - 1 - \text{P} + \text{UDP} - \text{Glc} \rightarrow \text{Glc} - 1 - \text{P} + \text{UDP} - \text{Gal}$$
$$(3)\ \text{UDP} - \text{Gal} \rightleftarrows \text{UDP} - \text{Glc}$$
$$\text{Soma}: \text{Gal} + \text{ATP} \rightarrow \text{Glc} - 1 - \text{P} + \text{ADP}$$

Metabolismo da frutose

A frutose é um componente da sacarose e também representa cerca de metade do açúcar presente no xarope de milho com alto teor de frutose

A frutose pode ser metabolizada nas células por duas vias, como mostrado na Figura 27.7. A frutose pode ser fosforilada pela hexocinase, uma enzima que está presente em todas as células; entretanto, a hexocinase tem uma forte preferência pela glicose como substrato, e a glicose, que está presente em concentrações em torno de 5 mmol/L no sangue, é um forte inibidor competitivo da fosforilação da frutose. A via primária de metabolismo da frutose, que é especialmente importante no fígado após as refeições, envolve a enzima frutocinase. Essa enzima é uma cinase muito específica que fosforila a frutose no carbono-1 (em vez da posição 6 como a hexocinase) para formar frutose-1-fosfato (Fru-1-P). A aldolase do fígado é chamada **aldolase B,** que tem especificidade de substrato diferente da aldolase A do músculo, porque a aldolase B pode clivar ambas Fru-1-P e Fru-1-6-P_2, enquanto a aldolase A cliva somente Fru-1,6-P_2. Assim, no fígado, os produtos da clivagem da frutose pela aldolase B são di-idroxiacetona-fosfato e gliceraldeído (e não gliceraldeído-3-P). O gliceraldeído precisa então ser fosforilado pela triose cinase para que seja metabolizado na glicólise.

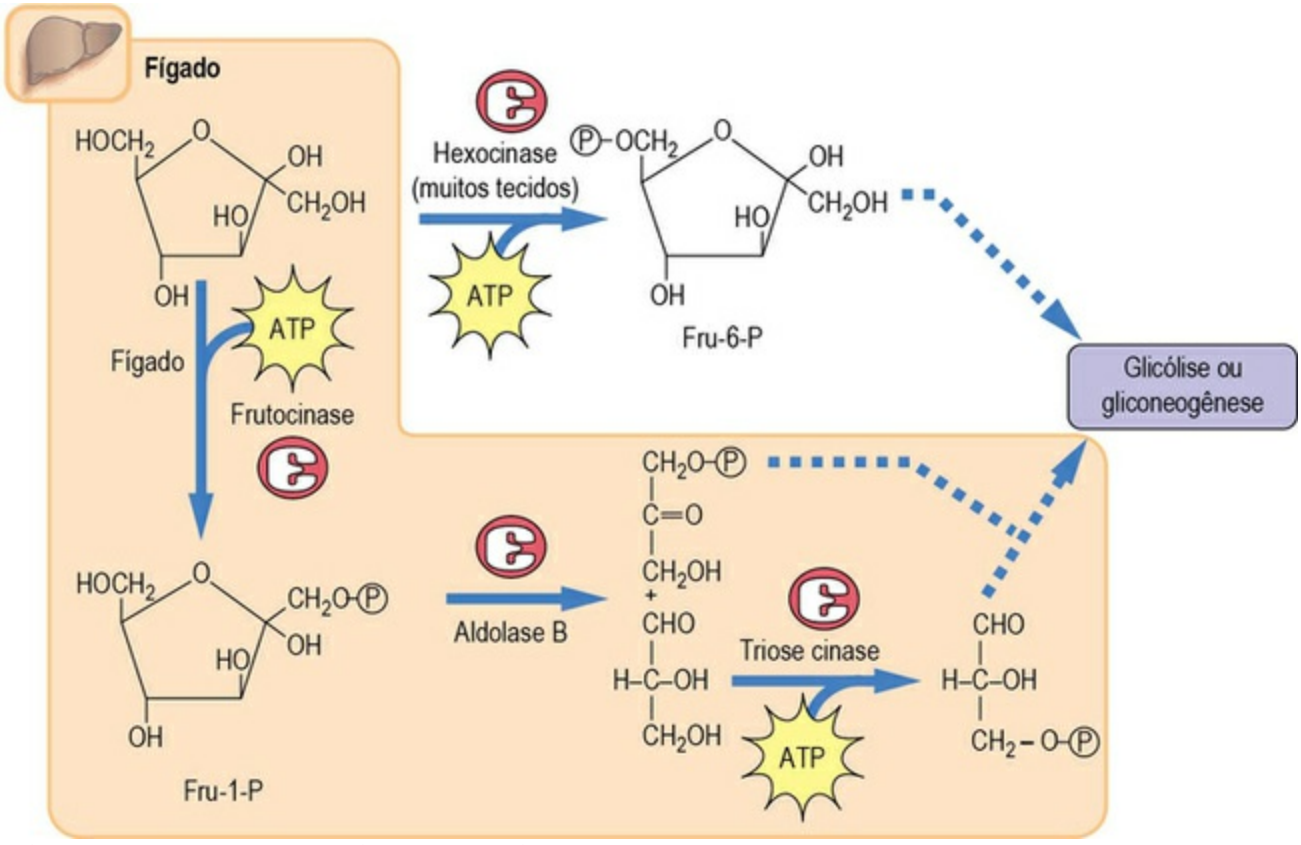


FIG. 27.7 Metabolismo da frutose pela frutocinase ou hexocinase.

Deve ficar claro que no fígado a frutose entra na glicólise no nível de intermediários da triose fosfato, em vez de Fru-6-P como no músculo. Assim, no fígado, a frutose ingerida não é submetida à regulação pelos pontos de controle comuns para as enzimas regulatórias, hexocinase e fosfofrutocinase. Por burlar esses dois passos limitantes, a frutose consiste em uma rápida fonte de energia para ambas as células, aeróbicas e anaeróbicas. Isto é parte da base para o desenvolvimento de bebidas ricas em frutose como o Gatorade®. A importância da frutocinase, em oposição à hexocinase, na via do metabolismo da frutose é indicada pela patologia de intolerância hereditária à frutose (ver Quadro Clínico a seguir).

Quadro de conceitos avançados

Biossíntese da lactose

Lactose sintase e α-lactoalbumina

A lactose (galactosil-β1,4-glicose) é sintetizada da UDP-Gal e glicose nas glândulas de mamíferos durante a lactação. A lactose sintase é formada pela ligação da **α-lactoalbumina** à galactosil transferase, que normalmente participa na biossíntese de glicoproteínas *N*-ligadas. A α-lactoalbumina, expressa somente nas glândulas de mamíferos durante a lactação, converte a galactosil transferase em lactose sintase por diminuir o K_m da enzima para glicose na ordem de grandeza de três, de 1 mol/L para 1 mmol/L, levando à síntese preferencial de lactose, em detrimento da galactosilação de glicoproteínas. A α-lactoalbumina é o único exemplo conhecido de uma **proteína**

"específica", que altera a especificidade de substrato de uma enzima.

Outras vias do metabolismo de açúcares nucleotídios

UDP-GlcUA

A UDP-Glc é precursora de uma série de outros açúcares, como o ácido glicurônico, xilose e galactose, os quais são necessários para a síntese de proteoglicanos e/ou glicoproteínas. As reações que levam à formação desses açúcares estão esboçadas nas Figuras 27.6 e 27.8. Uma oxidação em duas etapas pela enzima UDP-Glc desidrogenase leva à formação da forma ativada de ácido glicurônico (UDP-GlcUA) (Fig. 27.8). Este açúcar nucleotídio é o doador de ácido glicurônico, tanto para a formação de proteoglicanos (Cap. 29) quanto para as reações de detoxificação e conjugação que ocorrem no fígado para remover bilirrubina, fármacos e xenobióticos (Cap. 30). O UDP-GlcUA também é precursor de UDP-xilose, um açúcar nucleotídio do tipo pentose (Fig. 27.8). O UDP-GlcUA sofre uma reação de descarboxilação que remove o carbono-6 para formar UDP-xilose, a forma ativada da xilose. A xilose é o açúcar de ligação entre a proteína e o glicano nos proteoglicanos (Fig. 27.1B e Cap. 29). A xilose também está presente em muitas glicoproteínas de plantas como parte de seus oligossacarídios *N*-ligados, e é parcialmente responsável por reações alérgicas a proteínas do amendoim e das nozes.

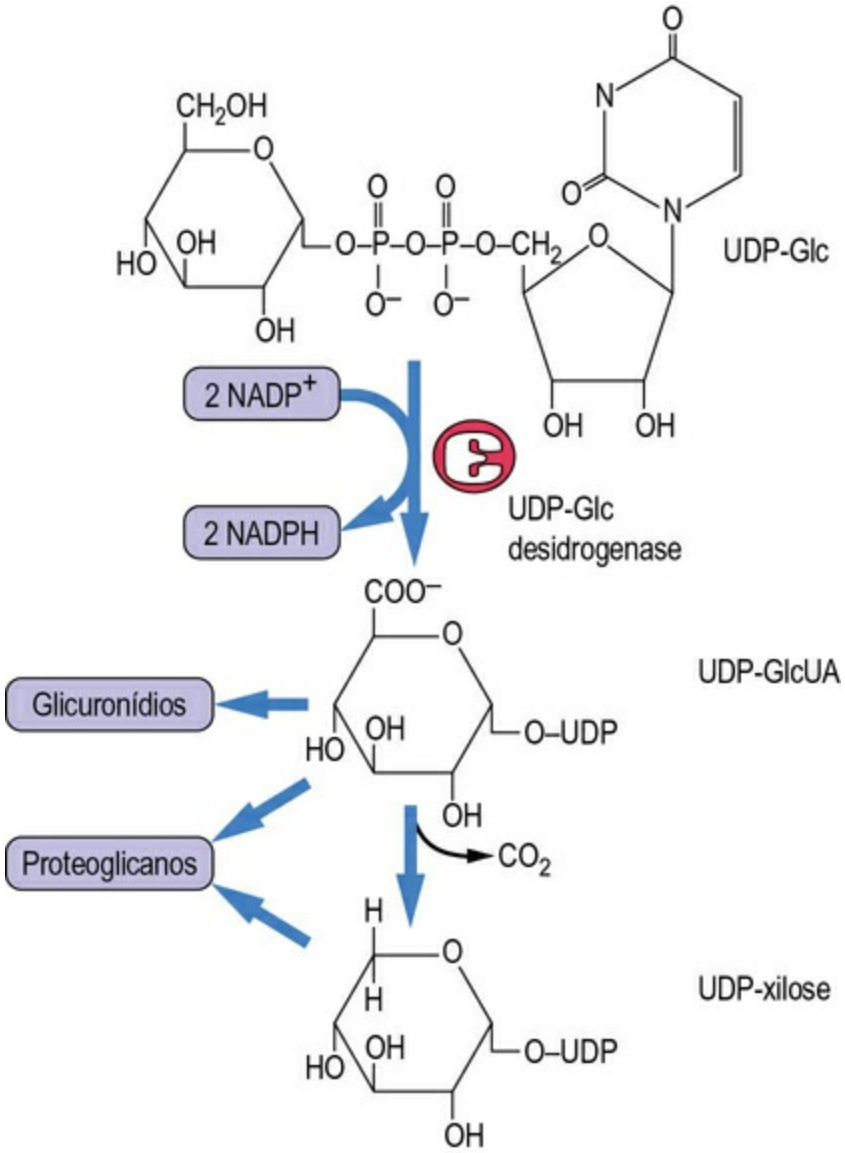


FIG. 27.8 Conversão de UDP-Glc em UDP-ácido glicurônico (UDP-GlcUA) e UDP-xilose. Note que a oxidação de UDP-Glc é uma reação em dois tempos, de álcool a aldeído, e então a um ácido. Ambas as reações são catalisadas pela UDP-Glc desidrogenase.

Quadro clínico

Galactosemia: uma criança que desenvolveu icterícia após alimentar-se de leite materno

Um recém-nascido aparentemente normal começou a vomitar e teve diarreia após ingerir leite materno. Esses problemas, e a desidratação, continuaram por vários dias, quando a criança começou a recusar alimento e a desenvolver icterícia indicativa de lesão no fígado, seguidas por hepatomegalia e opacificação do cristalino (cataratas). A dosagem de glicose no sangue pelo ensaio da glicose oxidada (Cap. 3) indicou que a concentração de glicose estava baixa, compatível com falha na absorção de nutrientes. Entretanto, a glicose dosada pelo método colorimétrico, que mede o açúcar redutor total (isto é, qualquer açúcar capaz de reduzir o cobre), indicou que a concentração de açúcar estava bastante alta, tanto no sangue quanto na urina. O açúcar redutor

acumulado foi identificado por fim como galactose, indicando uma anormalidade no metabolismo da galactose conhecida como galactosemia. Esses achados foram consistentes com a observação de que, quando o leite foi removido da dieta e substituído por uma fórmula infantil contendo sacarose em vez de lactose, o vômito e a diarreia pararam, e a função hepática melhorou gradativamente.

Comentário

O acúmulo de galactose no sangue na maioria das vezes é resultado de uma deficiência na enzima Gal-1-P uridil transferase (forma clássica da galactosemia), a qual evita a conversão da galactose à glicose e leva ao acúmulo de Gal e Gal-1-P nos tecidos. O acúmulo de Gal-1-P interfere com o metabolismo do fosfato e da glicose, levando à disseminação da lesão tecidual, falência de órgãos e retardo mental. Além disso, o acúmulo de galactose nos tecidos resulta na conversão de galactose, através da **via poliol**, em galactiol, a qual resulta, no cristalino ocular, em estresse osmótico e desenvolvimento de cataratas (comparar com catarata do diabético, Cap. 21). Outra forma de galactosemia é causada por deficiência de galactocinase, mas nesse caso a Gal-1-P não se acumula e as complicações são mais brandas.

GDP-Man e GDP-Fuc

A guanosina difosfato-manose (GDP-Man) é o substrato doador para a maioria das manosiltransferases. Como demonstrado na Figura 27.6, ela é produzida a partir da Man-6-P e é também a precursora da GDP-l-fucose (GDP-Fuc), que é o substrato doador para todas as fucosiltransferases. A fucose é uma 6-desoxi-hexose que é um importante açúcar, participando em muitas reações de reconhecimento em eventos biológicos, como a resposta inflamatória (Fig. 27.9). A conversão de GDP-Man em GDP-Fuc envolve uma série complexa de passos oxidativos e redutores, assim como epimerizações. A deficiência do transportador GDP-Fuc que transloca a GDP-Fuc do citosol para o lúmen do aparelho de Golgi encontra-se associada a uma resposta inflamatória defeituosa e a uma suscetibilidade à infecção aumentada (deficiência na adesão leucocitária II: LADII). A resultante depleção de GDP-Fuc no lúmen do aparelho de Golgi bloqueia a biossíntese da estrutura do **sinal de reconhecimento leucocitário, sialil Lewis-X** (Fig. 27.9).

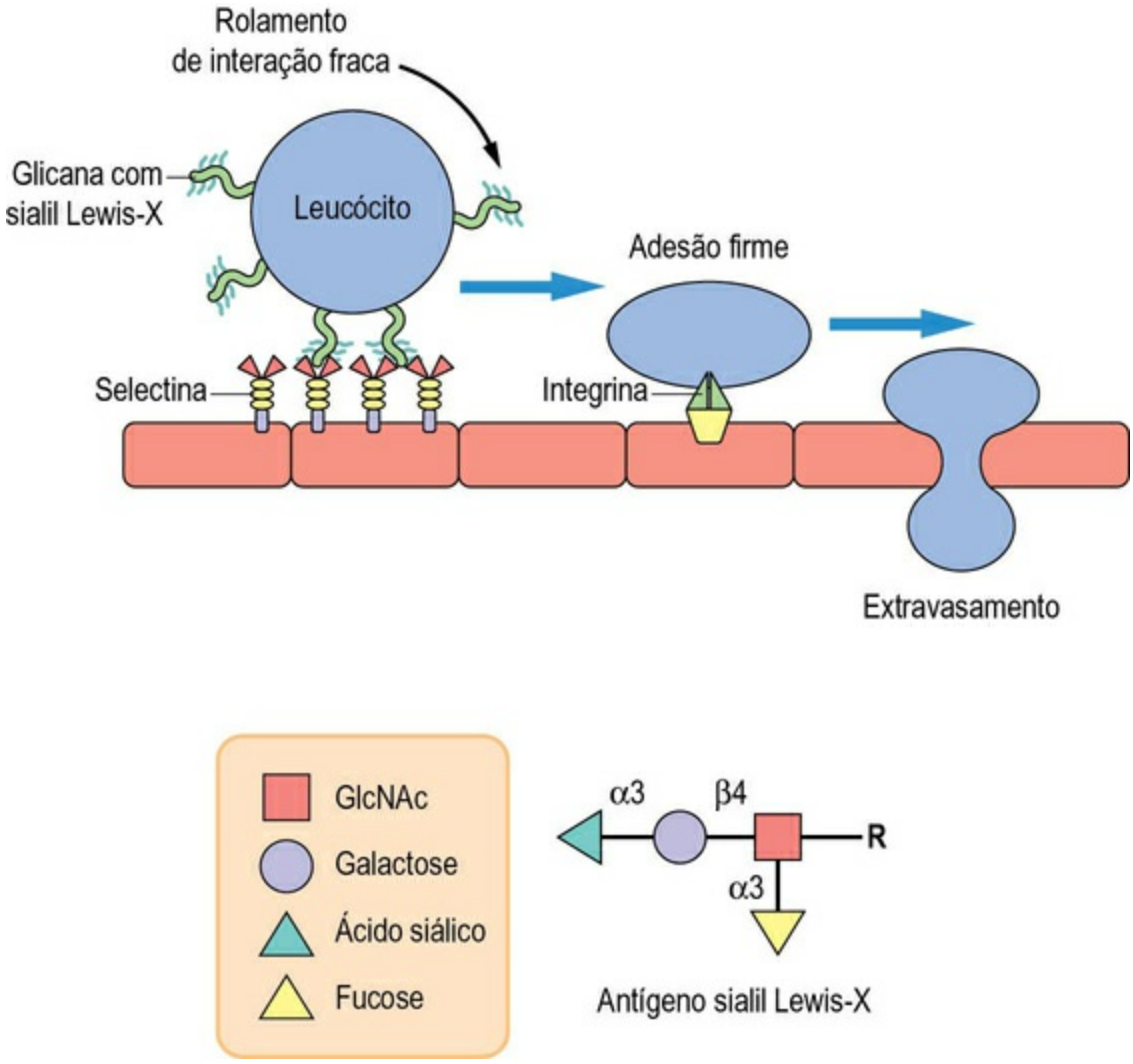


FIG. 27.9 Interações célula-célula dependentes de carboidratos na inflamação.
O sialil Lewis-X, um antígeno tetrassacarídio que forma parte da estrutura membranar dos leucócitos, é reconhecido por uma proteína ligante de carboidratos, a selectina (Sel), na superfície das células endoteliais. A interação sialil Lewis-X-selectina medeia a fraca ligação inicial que resulta no rolamento dos leucócitos ao longo da monocamada endotelial. Ela facilita a adesão firme mediada pelas interações proteína-proteína, levando ao extravasamento.

Quadro clínico

Intolerância hereditária à frutose: uma criança que desenvolveu hipoglicemia após comer fruta

Uma criança foi levada à sala de emergência sofrendo de náuseas, vômitos e sintomas de hipoglicemia juntamente com sudorese, tontura e tremedeira. Os pais indicaram que esses ataques ocorrem logo após a ingestão de frutas (frutose) ou balas (sacarose). Como resultado desses sintomas, a criança foi desenvolvendo uma forte aversão a frutas; então a mãe passou a fornecer uma grande suplementação com preparações multivitamínicas. A criança tinha peso abaixo do normal, mas não exibia qualquer um dos sintomas anteriores durante o período de tempo em que foi alimentada no peito. Uma série de exames clínicos demonstrou certa cirrose no fígado, e um teste de tolerância à glicose normal. Entretanto, substâncias redutoras foram

detectadas na urina, e estas substâncias redutoras não reagiram no teste da glicose oxidase (isto é, não são devido à glicose). O **teste de tolerância à frutose** foi realizado usando 3 g de frutose/m^2 de área de superfície corporal, dados intravenosamente em uma única e rápida injeção. Dentro de 30 minutos, a criança apresentou sintomas de hipoglicemia. A análise da glicose sanguínea confirmou isso e revelou que a hipoglicemia foi maior após 60-90 minutos. As concentrações de glicose alcançaram um máximo (3,3 mmol/L) após 15 minutos e diminuíram gradualmente a zero em três horas. A concentração de fosfato no plasma caiu 50% e os testes para as enzimas alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase indicaram que elas estavam elevadas após 90 minutos. A urina também foi positiva para frutose.

Comentário

Os resultados do teste de tolerância à frutose demonstraram um acúmulo de frutose e seus derivados no sangue e na urina. A elevação das enzimas do fígado, alanina e aspartato aminotransferase, bem como icterícia e outros sintomas, indicam lesão no fígado e sugerem que a Fru-1-P afeta o metabolismo de uma maneira similar à Gal-1-P na galactosemia.

Quadro de conceitos avançados

Interações célula-célula dependentes de carboidrato

Um importante exemplo de interações célula-célula dependentes de carboidratos ocorre durante a inflamação. Uma lesão ou a infecção das células endoteliais vasculares desencadeia uma resposta inflamatória que causa a liberação de citocinas, como o fator de necrose tumoral-α (TNF-α) e a interleucina-1 (IL-1), a partir do tecido danificado. Essas citocinas atraem leucócitos para o local da lesão ou infecção, no sentido de remover o tecido lesado ou os organismos invasores. Os leucócitos devem ser capazes de parar ou de sair da corrente sanguínea e se ligarem ao tecido danificado. Eles são capazes de fazer isso porque possuem um ligante de carboidratos à sua superfície que é reconhecido por uma **lectina** (proteína ligante de carboidratos), que se torna exposta à superfície das células endoteliais lesadas. O carboidrato ligante é um tetrassacarídio chamado antígeno sialil Lewis-X (Fig. 27.9), que é um componente de uma glicoproteína ou glicolipídio à superfície do leucócito. O antígeno sialil Lewis-X é reconhecido por lectinas, a **E-selectina** e a **P-selectina,** que são expressas à superfície das células endoteliais pela estimulação de citocinas. A Figura 27.9 apresenta esquematicamente os eventos sequenciais durante a adesão vascular e o extravasamento de leucócitos para o tecido inflamado. A interação sialil Lewis-X-selectina medeia o passo inicial da interação leucócitos-endotélio, que é descrita como uma adesão, seguida do rolamento de leucócitos ao longo da superfície das células endoteliais. Embora essa ligação carboidrato-proteína seja fraca e transiente, ela é capaz de atrasar os leucócitos em circulação sob uma forte força de cisalhamento no sangue e de promover firmes interações proteína-proteína entre as integrinas e seus

receptores. Eventualmente, os leucócitos migram através do endotélio para o tecido subjacente.

Por outro lado, a interação da L-selectina expressa nos linfócitos com um oligossacarídio semelhante ao sialil Lewis-X, expresso nas células endoteliais das vênulas endoteliais altas (HEV), permite aos linfócitos a circulação na corrente sanguínea para entrarem no nodo linfático por um mecanismo similar. Este processo é chamado de endereçamento *(homing)* de linfócitos.

Apesar de estas interações carboidrato-proteína desempenharem um papel crítico no sistema imune, elas podem ser perigosas e potencialmente fatais em outras circunstâncias. Algumas células tumorais utilizam tal interação carboidrato-proteína em sua metastização através da corrente sanguínea. Existe investigação ativa no desenvolvimento de fármacos cuja estrutura é similar à dos carboidratos (glicomiméticas), fármacos esses que irão bloquear a adesão vascular das células tumorais e prevenir a metástase.

Comentário

Esse exemplo de interação carboidrato-proteína é apenas um de muitos que ocorrem *in vivo*. Cada um desses tipos de interações envolve uma lectina diferente, cada uma das quais possui locais específicos de reconhecimento de carboidratos. Uma vez que a estrutura do carboidrato é conhecida e o local de ligação à proteína tenha sido mapeado, pode ser possível para os químicos desenharem compostos que simulem a estrutura do carboidrato. Esses compostos sintéticos devem se ligar ao local da lectina de reconhecimento ao carboidrato e bloquear a interação natural. Uma das dificuldades desse modelo é que as interações de ligações individuais são fracas, e múltiplos contatos célula-célula são necessários; estes podem ser difíceis de ser bloqueados por fármacos de moléculas pequenas. Um segundo problema é que a síntese de oligossacarídios específicos é difícil e cara, e que grande quantidade precisa ser injetada no sangue para uma terapia efetiva.

Açúcares aminados

Fru-6-P é o precursor de açúcares aminados

A Figura 27.10 mostra a via de formação da GlcNAc, GalNAc e ácido siálico. A reação inicial envolve a transferência de um grupo amino do nitrogênio amida da glutamina para Fru-6-P para produzir glicosamina-6-P (GlcN-6-P). Um grupo acetil é então transferido da acetil-CoA para o grupo amino da GlcN-6-P para formar GlcNAc-6-P, que é convertida em UDP-GlcNAc, sua forma ativada, por reações sequenciais da mutase e da pirofosforilase. Além do seu papel como doador de GlcNAc, a UDP-GlcNAc também pode ser epimerizada em UDP-GalNAc. Com poucas exceções, todos os açúcares aminados nos glicoconjugados são acetilados; portanto, são neutros e não contribuem com nenhuma carga iônica para os glicoconjugados.

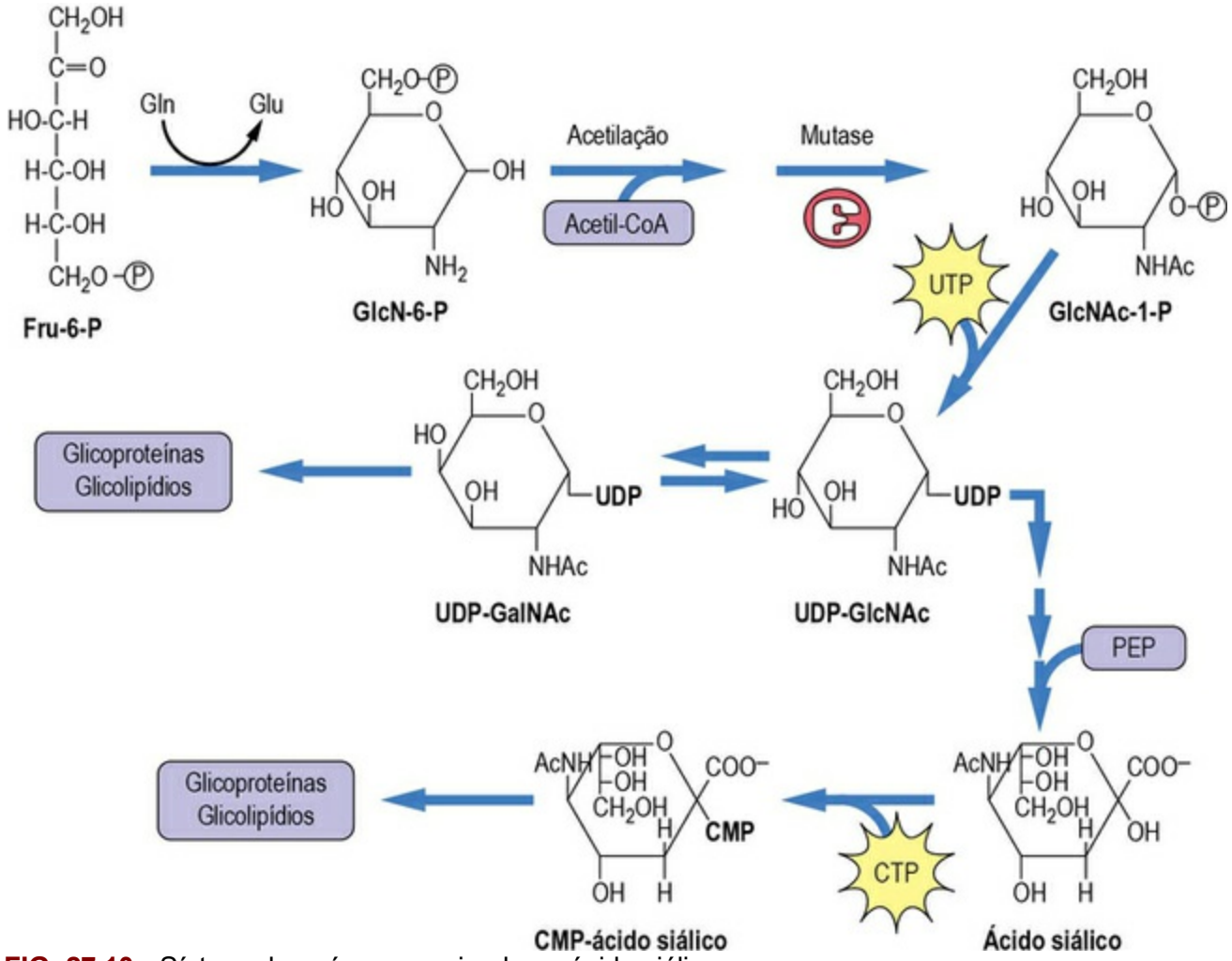


FIG. 27.10 Síntese de açúcares aminados e ácido siálico.
Acetil-CoA, acetil coenzima A; GlcN-6-P, glicosamina-6-fosfato; GlcNAc-6-P, *N*-acetilglicosamina-6-fosfato; GalNAc, acetilgalactosamina; HNAc, AcHN, grupamento acetamida; PEP, fosfoenolpiruvato.

Ácido siálico

A UDP-GlcNAc é o precursor do ácido *N*-acetil-neuramínico (NeuAc), também conhecido como ácido siálico. O ácido siálico, um ácido *N*-acetilamino-cetodeoxiglicônico de 9 carbonos, é produzido pela condensação de um açúcar aminado com o **fosfoenolpiruvato** (Fig. 27.10). O ácido neuramínico citidina monofosfato (NeuAc-CMP) é a forma ativada do ácido siálico e o doador de ácido siálico nas reações biossintéticas. O ácido siálico-CMP é o único nucleosídio monofosfato doador de açúcar no metabolismo de glicoconjugados.

Biossíntese de oligossacarídios

A montagem das N-glicanas se inicia no retículo endoplasmático

A via de síntese dos *N*-glicanos é iniciada com a transferência de dois resíduos de GlcNAc para um lipídio ligado à membrana, chamado dolicol-fosfato. Os resíduos de manose e glicose são adicionados para construir um oligossacarídio intermediário ligado ao lipídio, o qual é transferido "em bloco" para a proteína na luz do retículo

endoplasmático (Fig. 27.11). **Dolicóis** são derivados poli-isoprenoides de cadeia longa, contendo geralmente cerca de 120 átomos de carbono (cerca de 22-26 unidades isopreno) com um grupo fosfato em um terminal. Eles são sintetizados em membranas usando a mesma maquinaria que é usada para fazer o esterol, mas em contraste com o esterol, os dolicóis permanecem como longas cadeias lineares. A linearidade da cadeia é requerida para que seja estendida sinuosamente através da bicamada fosfolipídica, proporcionando um forte gancho para a cadeia oligossacarídica em crescimento.

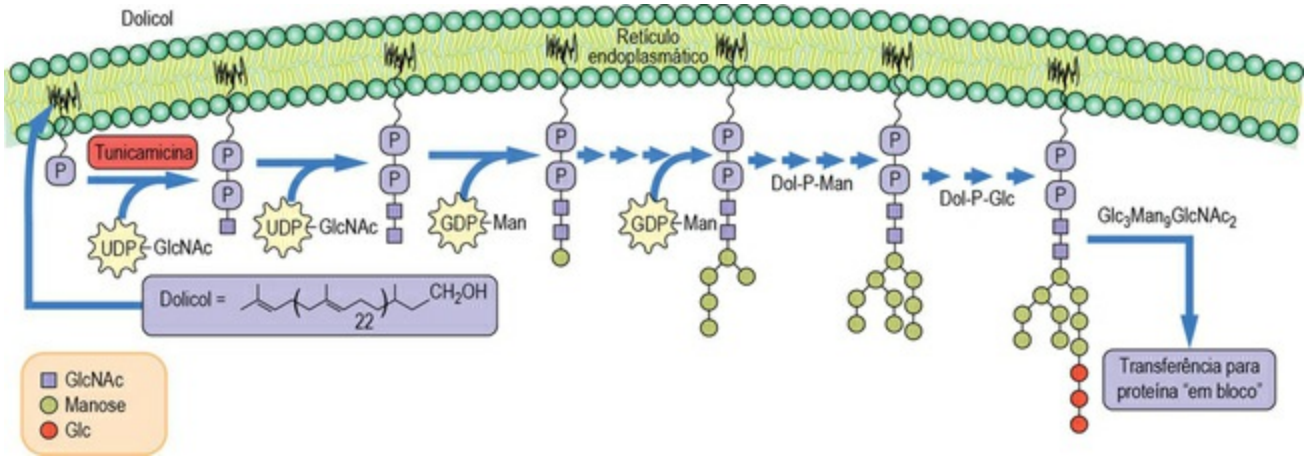


FIG. 27.11 Síntese de oligossacarídios *N*-ligados no retículo endoplasmático. A tunicamicina é um inibidor da GlcNAc fosfotransferase, que catalisa o primeiro passo na síntese de glicanas. GlcNAc, *N*-acetilglicosamina; Dol, dolicol; Man, manose.

O primeiro açúcar a ser adicionado ao dolicil-P a partir da UDP-GlcNAc é a GlcNAc-1-P, através de uma GlcNAc-1-P transferase, para produzir a dolicil-P-P-GlcNAc. A segunda GlcNAc é ligada à primeira GlcNAc, seguida da adição de quatro a cinco resíduos de manose a partir da GDP-Man. O dolicol-P-Man e o dolicol-P-Glc servem como doadores glicosídicos para as manoses e de três resíduos de glicose remanescentes, respectivamente. Cada um desses açúcares é transferido por uma glicosiltransferase específica localizada dentro ou na membrana do retículo endoplasmático. As glicoses não são encontradas em nenhum dos oligossacarídios *N*-ligados nas glicoproteínas, mas são removidas pelas glicosidases no retículo endoplasmático. Por que elas são adicionadas? Elas exercem duas funções muito importantes. Primeiro, a presença de glicose nos oligossacarídios associados a lipídio mostrou facilitar a transferência de oligossacarídio do lipídio para a proteína — a enzima de transferência (oligossacarídio transferase) tem preferência por oligossacarídios que contêm três glicoses e transfere estes oligossacarídios para a proteína muito mais rápido. Em segundo lugar, as glicoses são importantes para direcionar o enovelamento das proteínas no retículo endoplasmático (a seguir).

O processamento intermediário continua no retículo endoplasmático (RE) e no aparelho de Golgi

Em uma série de reações de adição e remoção (Fig. 27.12), todas as três glicoses são removidas no RE. O oligossacarídio pode então permanecer como um oligossacarídio rico

em manose ou pode ser posteriormente processado em uma estrutura de oligossacarídio complexa. Uma ou mais manoses podem ser removidas no RE, e a proteína enovelada é então translocada para o aparelho de Golgi, onde três ou quatro manoses adicionais podem ser removidas para deixar a estrutura central de três manoses e dois resíduos de GlcNAc. Esse oligossacarídio central é então alongado no aparelho de Golgi.

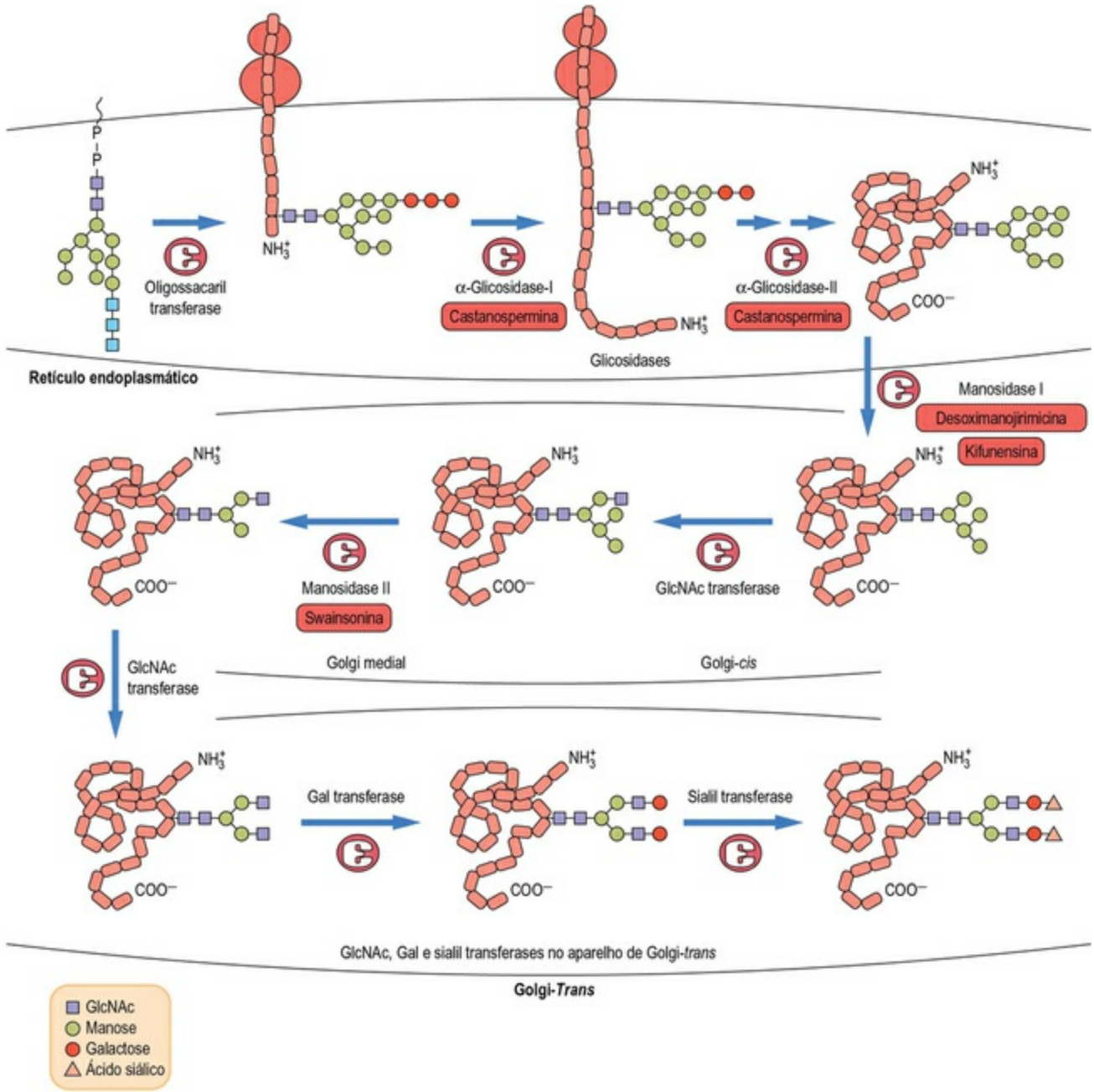


FIG. 27.12 Processamento de oligossacarídios *N*-ligados da forma rica em manose à forma complexa.
As glicoproteínas são transportadas entre o retículo endoplasmático e o compartimento de Golgi em vesículas. Os inibidores das enzimas processadoras de glicanas são apresentados em vermelho. GlcNAc, *N*-acetilglicosamina.

As modificações finais dos oligossacarídios *N*-ligados ocorrem no aparelho de Golgi

Após as reações de remoção no RE e enovelamento apropriado, a proteína com um ou mais oligossacarídios $Man_8GlcNAc_2$ é transportada para o aparelho de Golgi, onde outras

reações de modificação ocorrem (Fig. 27.12). Geralmente no Golgi-*cis*, várias outras manoses são removidas pelas α-manosidases para deixar somente a estrutura central. Também no Golgi-*cis*, resíduos de GlcNAc são adicionados a cada uma das manoses. Então, a proteína entra na fração Golgi-*trans*, onde os açúcares que restam das sequências trissacarídicas, isto é, galactose, ácido siálico e fucose, podem ser adicionados para fazer uma variedade de cadeias complexas diferentes. A estrutura final das cadeias de oligossacarídios depende das glicosiltransferases existentes na célula.

O-glicanos

As *O*-glicanas são sintetizadas no aparelho de Golgi

Em contrapartida com a biossíntese dos *N*-glicanos, a síntese dos *O*-glicanos ocorre somente no aparelho de Golgi pela adição sequencial de açúcares, dos seus açúcares derivados de nucleotídios, às proteínas. Nenhum intermediário lipídico está envolvido na formação de *O*-glicanos. A Figura 27.13 resume a sequência de reações envolvidas na síntese de uma cadeia oligossacarídica na mucina salivar. Nessa sequência, a GalNAc é primeiro transferida da UDP-GalNAc para resíduos de serina ou treonina na proteína, por ação da GalNAc transferase no aparelho de Golgi. A proteína serina-GalNAc resultante serve como aceptor para galactose, e então o ácido siálico é transferido de seus açúcares de nucleotídios (UDP-Gal e ácido siálico-CMP) pelas enzimas galactosiltransferase e sialil transferase do Golgi. Outras glicosiltransferases do Golgi estão envolvidas na biossíntese, passo a passo, de oligossacarídios mais complexos da mucina e na síntese de *O*-glicanos nos proteoglicanos e colágenos (Cap. 29). Existem mais de cem glicosiltransferases envolvidas na síntese de glicoconjugados em uma célula típica.

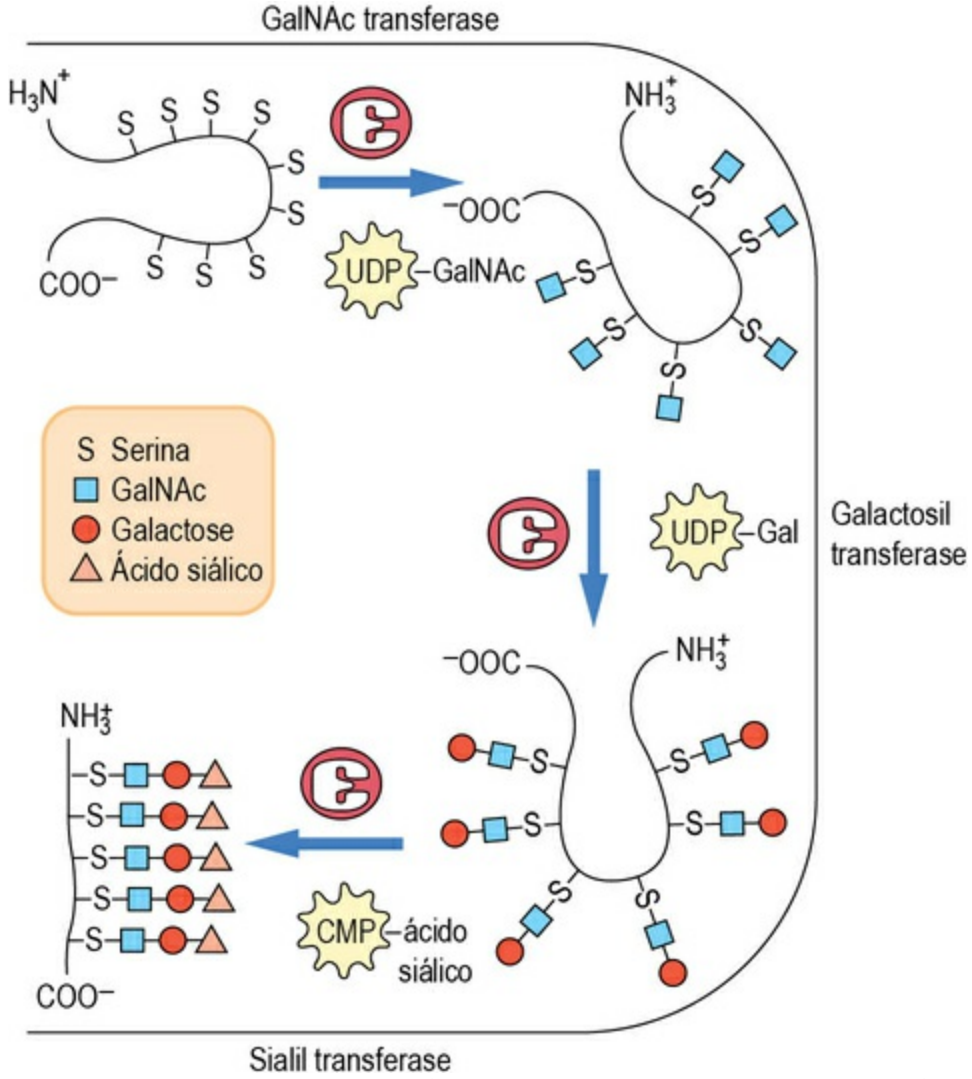


FIG. 27.13 Biossíntese de oligossacarídios *O*-ligados de mucinas no aparelho de Golgi. GalNAc, *N*-acetilgalactosamina.

Funções das cadeias de oligossacarídios das glicoproteínas

N-glicanos têm importante papel no enovelamento de proteínas

Proteínas residentes no retículo endoplasmático, conhecidas como **chaperonas,** auxiliam as proteínas recém-sintetizadas a se enovelarem em suas conformações apropriadas. Duas dessas chaperonas, a calnexina e a calreticulina, ligam-se a glicoproteínas não enoveladas com o reconhecimento dos oligossacarídios ricos em manose que ainda contêm uma única glicose remanescente em sua estrutura, após as glicosidases terem removido duas das três glicoses. Nem todas as glicoproteínas sintetizadas na célula requerem auxílio no enovelamento, mas para aquelas que precisam, a taxa de enovelamento é altamente acelerada pelas chaperonas. Proteínas incorretamente enoveladas ou desenoveladas não sofrem o transporte normal para o aparelho de Golgi e, se não enovelam adequadamente, precipitam no retículo endoplasmático e são subsequentemente degradadas pelo sistema ubiquitina-proteassoma no citoplasma.

Os oligossacarídios contendo Man-6-P direcionam enzimas lisossomais para o lisossomo

Os lisossomos são organelas subcelulares envolvidas na hidrólise e renovação de muitas organelas e proteínas celulares. Eles contêm várias enzimas com pH ótimo ácido. A maioria das enzimas lisossomais são glicoproteínas *N*-ligadas, que são sintetizadas e glicosiladas no retículo endoplasmático e no aparelho de Golgi. O direcionamento das enzimas lisossomais ocorre no Golgi-cis. As proteínas destinadas aos lisossomos contêm um conjunto de resíduos de lisina que ficam reunidos como resultado do enovelamento da proteína em sua conformação apropriada. Como mostrado na Figura 27.14, esse *cluster* de resíduos de lisina serve como um sítio de ancoramento para uma enzima, a GlcNAc-1-P transferase, que transfere uma GlcNAc-1-P da UDP-GlcNAc para o resíduo de manose terminal, nas cadeias ricas em manose das enzimas lisossomais. Uma segunda enzima, chamada hexosaminidase, remove a GlcNAc, deixando os resíduos de fosfato ainda ligados às manoses nas cadeias ricas em manose. Os resíduos de Man-6-P resultantes na estrutura rica em manose são reconhecidos por uma proteína do Golgi chamada receptor de Man-6-P, que direciona a enzima para os lisossomos. Assim, **os resíduos de Man-6-P são um sinal-alvo** usado pela célula para classificar aquelas proteínas que são destinadas a irem para o lisossomo e separá-las de todas as outras proteínas que estão sendo sintetizadas no aparelho de Golgi. O receptor de Man-6-P também está presente na superfície das células, de modo que mesmo as enzimas extracelulares que tenham este sinal são endocitadas e transportadas para os lisossomos.

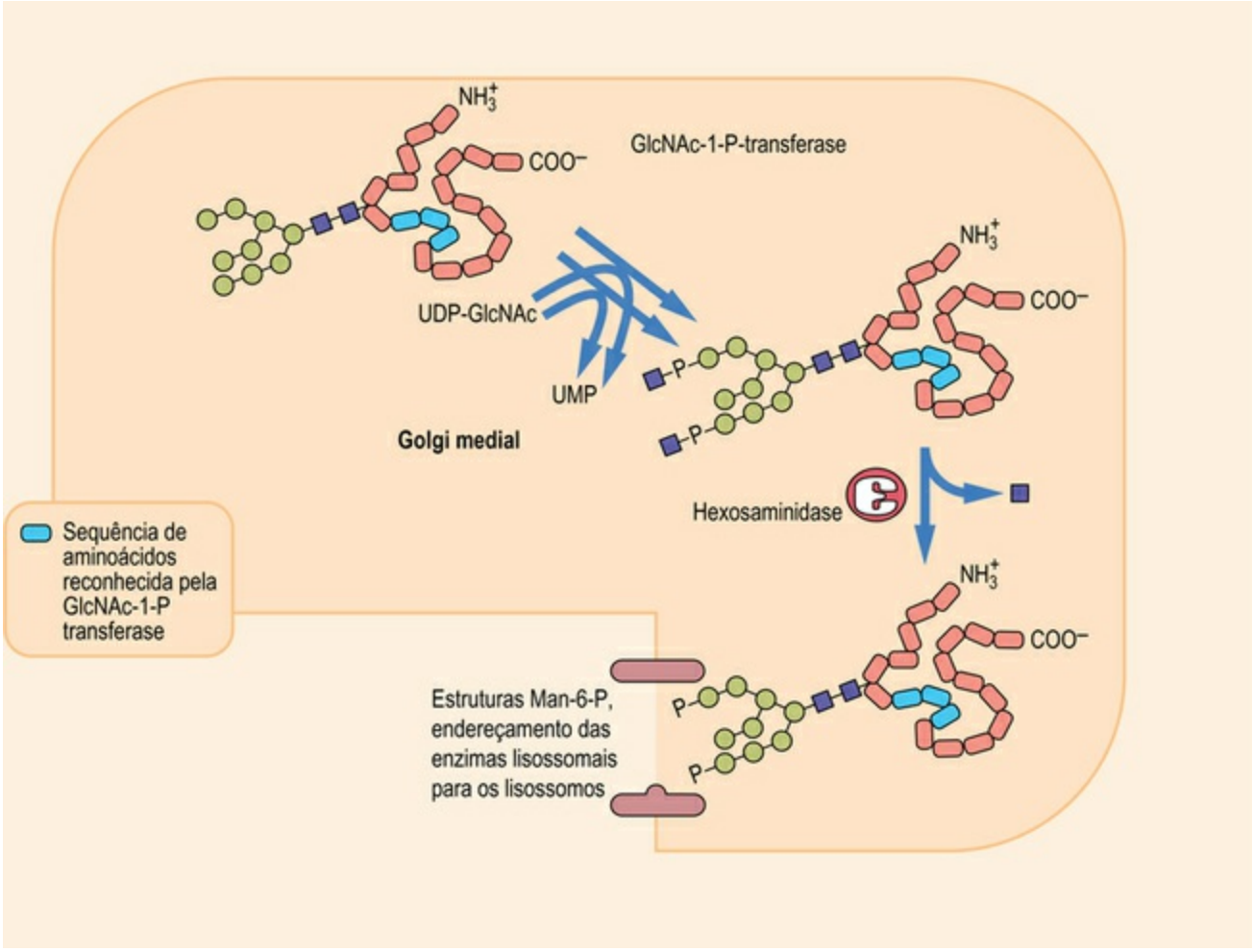


FIG. 27.14 Endereçamento de enzimas lisossomais para os lisossomos. GlcNAc, *N*-acetilglicosamina; Man, manose.

Quadro de conceitos avançados

Inibidores da biossíntese de glicoproteínas

Diversos inibidores da síntese de *N*-glicanos têm sido identificados, e esses compostos têm se provado valiosos reagentes para estudos sobre o papel de estruturas de carboidratos específicas na função das glicoproteínas. **Tunicamicina** é um antibiótico glicosídico que inibe o primeiro passo na síntese de *N*-glicanos, isto é, a formação de dolicol-PP-GlcNAc (Fig. 27.11). A tunicamicina tem vários efeitos sobre a síntese de glicoproteínas e sobre as células, de benignos a profundos. Em alguns casos, a porção proteica da glicoproteína é sintetizada, mas na ausência de seu carboidrato é mal enrolada, se agrega e é degradada na célula. Assim, o tratamento das células com tunicamicina induz frequentemente estresse no retículo endoplasmático (RE) (Cap. 34).

Outros inibidores inibem passos específicos na via de processamento. Muitos são alcaloides de plantas que estruturalmente se parecem com os açúcares glicose e manose, e inibem as glicosidases removedoras (Fig. 27.12). A castanospermina inibe as glicosidases do RE, enquanto a kifunensina, a desoximanojirimicina e a swainsonina inibem, cada uma, uma manosidase processadora diferente. Esses fármacos evitam a

formação de cadeias complexas, portanto são úteis para avaliar as relações estrutura-função. Alguns compostos foram testados contra o HIV e contra alguns cânceres, e têm mostrado efeitos inibitórios positivos. Entretanto, eles também têm efeitos adversos sobre outras enzimas em células normais e não são, portanto, usados como fármacos viáveis. Com compostos mais específicos, pode ser possível manipular as estruturas dos glicanos para propósitos terapêuticos.

As cadeias oligossacarídicas das glicoproteínas frequentemente aumentam a solubilidade e estabilidade das proteínas

Em razão de os oligossacarídios serem hidrofílicos, eles aumentam a solubilidade de proteínas no meio aquoso. Assim, a maioria das proteínas que são secretadas pelas células são glicoproteínas, incluindo as proteínas do plasma, com exceção da albumina plasmática. Essas glicoproteínas e enzimas geralmente também têm alta estabilidade ao calor, desnaturantes químicos, detergentes, ácidos e bases. A remoção enzimática dos carboidratos de muitas dessas proteínas reduz muito sua estabilidade ao estresse. Na verdade, quando as glicoproteínas são sintetizadas nas células em presença de inibidores de glicosilação, como a tunimicina, que impede a produção e, portanto, a ligação da cadeia de *N*-glicanos, muitas dessas proteínas tornam-se insolúveis e formam inclusões nas células como resultado de um enovelamento incorreto e/ou diminuição da hidrofilicidade.

Os açúcares estão envolvidos nas interações de reconhecimento químico com as lectinas

Os *N*-glicanos de superfície das células de mamíferos têm papel fundamental nas interações célula-célula e outros processos de reconhecimento. Uma célula pode conter em sua superfície uma proteína reconhecedora de carboidrato, conhecida como lectina, que se liga a estruturas oligossacarídicas específicas na superfície da célula complementar. A interação entre essas duas interfaces químicas medeia um reconhecimento químico específico entre as células, e tal processo é um fator-chave na fertilização, inflamação, infecção, desenvolvimento e diferenciação.

As interações proteína-carboidrato também são importantes nas interações com estruturas não próprias. Muitos patógenos usam esse mecanismo para reconhecer suas células-alvo. A *E. coli*, por exemplo, e algumas outras bactérias entéricas Gram-negativas têm curtas projeções semelhantes a pelos em suas superfícies, chamadas pili. Essas pili têm lectinas ligantes de manose em sua extremidade, que podem reconhecer e se ligar a oligossacarídios ricos em manose na membrana da borda em escova das células epiteliais intestinais. Essa interação permite à bactéria ser retida no intestino. O vírus influenza usa a proteína hemaglutinina em sua superfície para se ligar aos resíduos de ácido siálico nas glicoproteínas e glicolipídios da superfície de células-alvo.



Quadro clínico

Deficiência na síntese de glicoproteínas

Os **defeitos congênitos de glicosilação (DCG)** consistem em um grupo de doenças genéticas raras descrito recentemente que afeta a biossíntese das glicoproteínas. Todos os pacientes mostram patologia multissistêmica, com grave envolvimento do sistema nervoso. Três classes distintas foram identificadas até o momento e são caracterizadas por uma deficiência na estrutura do carboidrato ligado às glicoproteínas do soro, enzimas lisossomais ou glicoproteínas de membrana. O diagnóstico dessa doença é rotineiramente feito por eletroforese da transferrina do soro. Nas CDGS, a transferrina contém menos ácido siálico e, portanto, a proteína migra mais lentamente. A diminuição do ácido siálico resulta de um defeito na biossíntese da estrutura oligossacarídica principal. Enquanto a mudança na migração da transferrina do soro indica que o paciente está sofrendo de uma das DCG, isso não identifica a lesão específica. Isso pode ser feito somente caracterizando a estrutura da(s) cadeia(s) de oligossacarídio alteradas para determinar quais açúcares ou estruturas estão faltando, ou fazendo o perfil das enzimas-chave da via de biossíntese, desde que a ausência de qualquer uma dessas enzimas afete a estrutura final do oligossacarídio.

Comentário

Os defeitos básicos nesse grupo de doença parecem estar na síntese ou processamento dos *N*-glicanos. Entretanto, defeitos na fosfomanose isomerase e fosfomanose mutase também têm sido identificados como causa da DCG.



Quadro clínico

Doença de célula-i

A doença de célula-I (mucolipidose II) e a polidistrofia pseudo-Hurler (mucolipidose III) são doenças inatas raras causadas por deficiências na maquinaria que direciona as enzimas lisossomais para os lisossomos. A apresentação clínica inclui grave retardo psicomotor, traços faciais grosseiros e anormalidades esqueléticas; a morte geralmente ocorre na primeira década de vida. Em culturas de fibroblastos extraídos de pacientes com mucolipidose II, enzimas lisossomais recém-sintetizadas são secretadas no meio extracelular em vez de serem endereçadas corretamente para os lisossomos. Células mesenquimais, especialmente fibroblastos, contêm numerosos vacúolos ligados à membrana no citoplasma, contendo material fibrilogranular. Esses depósitos são chamados de corpos de inclusão e essa é a origem do nome doença de célula-I.

Comentário

A doença de célula-I resulta de uma deficiência na síntese do sinal de endereçamento, resíduos de Man-6-P nos oligossacarídios ricos em manose. A mutação mais comum é a ausência da GlcNAc-1-P fosfotransferase, mas defeitos na hexosaminidase também ocorrem. É provável que a ausência da proteína receptora de Man-6-P pudesse gerar o mesmo fenótipo. Na doença de célula-I os lisossomos, deficientes em todo o espectro

de enzimas hidrolases, tornam-se repletos de substâncias não digeríveis.



Quadro de teste clínico

Toxicidade da ricina e outras lectinas

As lectinas são encontradas em uma variedade de alimentos, incluindo feijões, amendoim e cereais secos. Muitas lectinas de plantas são tóxicas para as células animais. Nas plantas comestíveis podem não representar um problema desde que o alimento seja cozido, e as lectinas sejam desnaturadas, ficando, portanto, suscetíveis às proteases intestinais. Por sua vez, as lectinas em plantas não cozidas são bastante resistentes às proteases e podem, portanto, causar sérios problemas. Elas se ligam às células no trato gastrintestinal inibindo atividades enzimáticas, a digestão dos alimentos e absorção dos nutrientes, causando desconforto gastrintestinal e reações alérgicas.

A **ricina,** produzida pela planta mamona, está entre as proteínas mais tóxicas já conhecidas pelo homem. Esses tipos de lectinas tóxicas são geralmente compostos de várias subunidades, uma das quais é o sito ligante ou de reconhecimento de carboidrato, enquanto a outra subunidade é uma enzima que pode cataliticamente inativar os ribossomos. Assim, a entrada de uma única molécula dessa subunidade catalítica na célula pode bloquear completamente a síntese proteica naquela célula. Outras lectinas tóxicas incluem a modecina, abrina e lectina I do visco.

Variações na estrutura da mucina parecem ter função específica na fertilização, diferenciação celular, desenvolvimento de resposta imune e infectividade do vírus. A glicoproteína ZP3, que está presente na zona pelúcida do óvulo de camundongos, funciona como um receptor para o espermatozoide durante a fertilização. A remoção enzimática de *O*-glicanos da ZP3 resulta na perda da atividade de receptor para o espermatozoide, enquanto a remoção de *N*-glicanos não tem nenhum efeito sobre a ligação do espermatozoide. Os *O*-glicanos isolados da ZP3 também possuem atividade de ligação ao espermatozoide e inibem a interação óvulo-espermatozoide e a fertilização *in vitro*. Diferenças entre as estruturas *O*-glicano de linfócitos citotóxicos e células auxiliares envolvidas na resposta imune também são consideradas importantes em mediar interações celulares durante a resposta imune.



Quadro clínico

Mudanças na composição e/ou estrutura do açúcar podem ser marcadores diagnósticos de alguns tipos de câncer

Mudanças na glicosilação de proteínas e lipídios têm sido relatadas nos carboidratos de superfície celular de vários tipos de células cancerosas, incluindo melanomas,

câncer de ovário e carcinoma hepatocelular. Enquanto essas alterações não são consideradas causas da doença, elas têm sido avaliadas como ferramentas diagnósticas para detecção precoce da doença. Níveis aumentados da enzima GlcNAc transferase V (a transferase envolvida na adição de um segundo [ramificador] resíduo de GlcNAc ao resíduo de manose para fazer uma cadeia complexa triantenária) são altamente expressos em algumas células transformadas, resultando em aumento das ramificações e produção de oligossacarídios *N*-ligados maiores. Alterações nos oligossacarídios *O*-ligados também têm sido descritas, por exemplo, níveis aumentados do antígeno sialil Lewis-X, o qual se acredita contribuir para a metástase. Mudanças na quantidade e sialização de mucinas também estão associadas a metástases de pulmão e células de carcinoma de colo e estão sendo estudadas para sua aplicabilidade como biomarcadores de diagnóstico ou prognóstico.

Também existe evidência de que alterações no nível de fucose em algumas glicoproteínas regulam o fenótipo biológico das células cancerosas, e de fato a fucosilação da proteína α-fetoproteína (AFP-L3) tem sido usada clinicamente como um marcador para carcinoma hepatocelular.

Comentário

A estrutura e a composição de glicoproteínas e glicolipídios estão alteradas em células tumorais, comparadas às células normais. Enquanto essas mudanças podem não provocar o câncer, elas podem ter um efeito significante na clínica, por exemplo, se elas limitam o infiltrado leucocitário, ajudam no escape à vigilância imune ou facilitam a metástase. A análise das estruturas oligossacarídicas pode ser útil para detecção precoce e propósitos diagnósticos, e a manipulação de estruturas oligossacarídicas pode ser útil no tratamento de alguns cânceres.

Resumo

- A glicosilação é a maior modificação pós-traducional das proteínas teciduais.
- A glicosilação é uma atividade multicomportamental, envolvendo a interconversão de açúcares e ativação de compartimentos citosólicos, formando estruturas complexas nos intermediários lipídicos no RE, e glicosilação e reações de clivagem no RE e no aparelho de Golgi. O resultado é uma grande variedade de estruturas de oligossacarídios em proteínas.
- Esses açúcares podem ter diversas funções diferentes, incluindo:
 - modificação das propriedades físicas das proteínas (solubilidade, estabilidade e/ou viscosidade);
 - auxílio no enovelamento de proteínas;
 - participação no endereçamento de proteínas para sua localização apropriada na célula;
 - mediação dos reconhecimentos célula-proteína e célula-célula durante a fertilização, desenvolvimento, inflamação e outros processos.
- Várias doenças humanas envolvem defeitos no metabolismo de açúcares, incluindo a

galactosemia e a intolerância hereditária à frutose, a deficiência na adesão leucocitária, defeitos congênitos da glicosilação (DCG) e doenças de sobrecarga lisossomal.

Questões para aprendizagem

1. Por que as células eucarióticas usam oligossacarídios ligados a lipídios como intermediários na síntese de *N*-glicanos, mas não de *O*-glicanos?
2. As células animais precisam de açúcares aminados na dieta para sintetizarem carboidratos complexos? Se não, por quê? Reveja o uso de suplementos de condroitin-glicosamina para o tratamento de artrite.
3. Descreva o papel das interações célula-célula dependentes de carboidrato durante o desenvolvimento do sistema nervoso ou imune.

Leituras sugeridas

Asano, N. Sugar-mimicking glycosidase inhibitors: bioactivity and application. *Cell Mol Life Sci*. 2009; 66:1479–1492.

Etzioni, A. Genetic etiologies of leukocyte adhesion defects. *Curr Opin Immunol*. 2009; 21:481–486.

Kato, K., Kamiya, Y. Structural views of glycoprotein-fate determination in cells. *Glycobiology*. 2007; 17:1031–1044.

Martin, P. T. Congenital muscular dystrophies involving the *O*-mannose pathway. *Curr Mol Med*. 2007; 7:417–425.

Schachter, H., Freeze, H. H. Glycosylation diseases: Quo vadis? *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1792:925–930.

Taylor, M. E., Drickmer, K. *Introduction to glycobiology*, ed 2. New York: Oxford University Press; 2006.

Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., et al. *Essentials of glycobiology*, ed 2. New York: Cold Spring Harbor Press; 2009.

Zeidan, Q., Hart, G. W. The intersections between O-GlcNAcylation and phosphorylation: implications for multiple signaling pathways. *J Cell Sci*. 2010; 123:13–22.

Sites

Congenital disorders of glycosylation: www.familyvillage.wisc.edu/lib_cdgs.htm
Galactosemia: http://galactosemia.org/
Glycoprotein biosynthesis: http://www.ccrc.uga.edu/~lwang/bcmb8020/N-glycans-A.pdf
Glycoprotein topics: www.glycoforum.gr.jp/science/word/glycoprotein/GP_E.html
Hereditary fructose intolerance: www.bu.edu/aldolase/HFI/
I-cell disease: http://emedicine.medscape.com/article/945460-overview
Plant lectins: www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/lectins.html

CAPÍTULO 28

Lipídios Complexos

†Alan D. Elbein and Koichi Honke

Objetivos

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever como os vários fosfolipídios baseados em glicerol são sintetizados e como eles são interconvertidos.
- Descrever os múltiplos papéis dos nucleotídios citidina na ativação de intermediários na síntese dos fosfolipídios.
- Descrever os vários tipos de esfingolipídios e glicolipídios que ocorrem em células de mamíferos e suas funções.
- Explicar a etiologia das doenças de armazenamento lisossomal, sua patologia, e o racional da terapia de reposição de enzimas para o tratamento dessas doenças.

Introdução

Os lipídios complexos abrangem os glicerofosfolipídios, introduzidos no Capítulo 3, e os esfingolipídios. Essas moléculas são encontradas em sua maioria em duas localizações: embebidas em membranas biológicas ou nas lipoproteínas circulantes. Os esfingolipídios são quase exclusivamente encontrados nas membranas celulares, e, sobretudo, na membrana plasmática. Eles carreiam muitos carboidratos na face que está em contato com o ambiente exterior, como as glicoproteínas, que têm amplas funções de reconhecimento. A maior diferença entre essas duas classes de lipídios é que os glicerofosfolipídios são saponificáveis (exceto os plasmalogênios), enquanto os **esfingolipídios** não contêm ligações ésteres alcalilábeis. Assim, foi conveniente isolar os esfingolipídios dos tecidos por saponificação, fazendo então a extração dos lipídios remanescentes em solventes orgânicos. Uma vez isolado, a caracterização da estrutura glicana dos esfingolipídios foi tecnicamente desafiadora. Por isso, as estruturas foram, por um longo tempo, desconhecidas e misteriosas, levando ao seu nome: semelhantes à

esfinge ou esfingolipídios.

Este capítulo discute a estrutura, biossíntese e função das duas maiores classes de lipídios polares: os glicerofosfolipídios e os esfingolipídios. Em uma preparação para este capítulo, a revisão das estruturas dos fosfolipídios no Capítulo 3 deve ajudar.

Síntese e *turnover* de glicerofosfolipídios

Síntese de glicerofosfolipídios

Existem muitas espécies de glicerofosfolipídios com uma composição distinta de grupamentos cabeça polar e grupos acila hidrofóbicos (Cap. 3). No que respeita aos grupos acila, os ácidos graxos saturados são geralmente esterificados na posição *sn*-1, enquanto os ácidos graxos insaturados são esterificados na posição *sn*-2. A biossíntese de glicerofosfolipídios se processa primeiramente pela via *de novo,* e, subsequentemente, os ácidos graxos originalmente ligados na via *de novo* são substituídos por novos na via de remodelação. Através desta via de remodelação, é gerada a diversidade e assimetria dos grupos acila.

Via *de novo*

Os fosfolipídios estão em um estado constante de síntese, *turnover* e remodelação

A via *de novo* começa com reações sequenciais, nas quais o glicerol-3-P é acilado pela transferência de dois ácidos graxos da acil-CoA para produzir **ácido fosfatídico** (PA) via um intermediário, o ácido lisofosfatídico (Fig. 28.1). Em seguida, o PA é desfosforilado a **diacilglicerol** (DAG) por uma fosfatase citosólica específica. Alternativamente, o PA reage com o trifosfato de citidina (CTP) para gerar o ácido fosfatídico ativado, o difosfato de citidina, (CDP)-DAG. O ácido fosfatídico e o DAG são intermediários comuns na síntese tanto dos triglicerídios (triacilgliceróis) como dos fosfolipídios. Todas as células animais, excetuando os eritrócitos, são capazes de sintetizar fosfolipídios *de novo,* enquanto a síntese de triglicerídios ocorre maioritariamente no fígado, tecido adiposo e células intestinais. O material de partida, o **glicerol-3-fosfato,** é formado na maioria dos tecidos por redução do intermediário glicolítico di-hidroxiacetona fosfato (DHAP). No fígado, rim e intestino, o glicerol-3-P pode também ser formado diretamente por fosforilação do glicerol por uma cinase específica. A DHAP pode igualmente ser acilada por adição de um ácido graxo ao grupo 1-hidroxila; esse intermediário é então reduzido e acilado a PA.

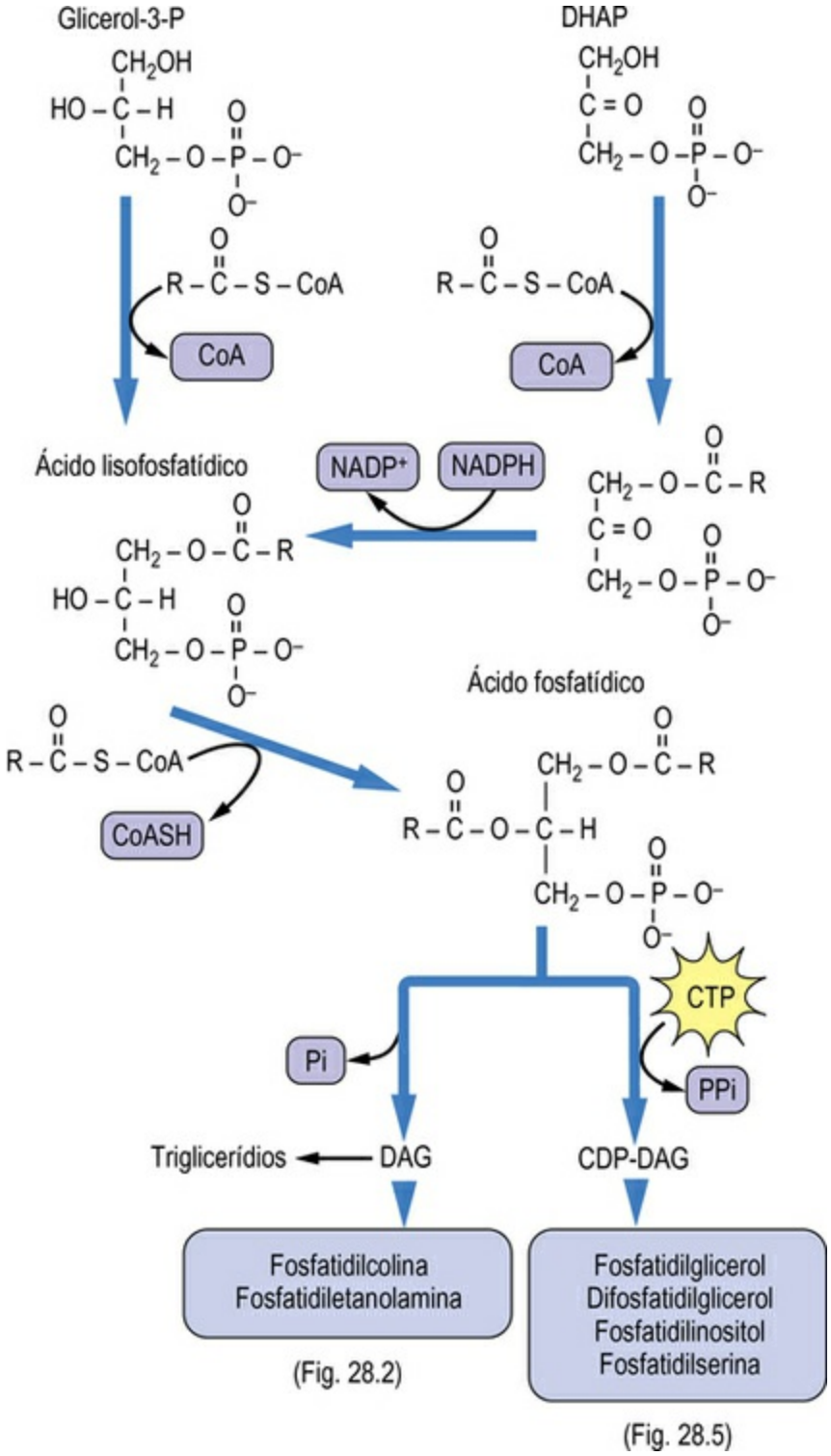


FIG. 28.1 Via *de novo* para a síntese de glicerofosfolipídios.
CDP, difosfato de citidina; CDP-DAG, CDP-diacilglicerol; CTP, trifosfato de citidina; CoAS, coenzima A; DHAP, di-hidroxiacetona fosfato; Pi, fosfato inorgânico; PPi, pirofosfato inorgânico.

A biossíntese do principal fosfolipídio, a fosfatidilcolina (PC, também conhecida como **lecitina**) a partir do DAG requer a ativação da colina a CDP-colina. Nesta série de reações, apresentada na Figura 28.2, o "grupamento cabeça" da colina é convertido em fosfocolina e, então, ativado a CDP-colina por uma reação de fosforilase. A ligação pirofosfato é clivada e a fosfocolina (fosfato de colina) é transferida para o DAG para formar PC. Essa reação é análoga à transferência de GlcNAc-6-P para o dolicol ou para as enzimas lisossomais com um núcleo rico em manose — tanto o açúcar quanto o fosfato são transferidos do derivado nucleotídico. A fosfatidiletanolamina (PE) é formada por uma

via similar, usando CTP e fosfoetanolamina para formar CDP-etanolamina. Quer a PC quer a PE podem reagir com a serina livre, por uma reação de troca, para formar a fosfatidilserina (PS) e a base livre, colina ou etanolamina (Fig. 28.3).

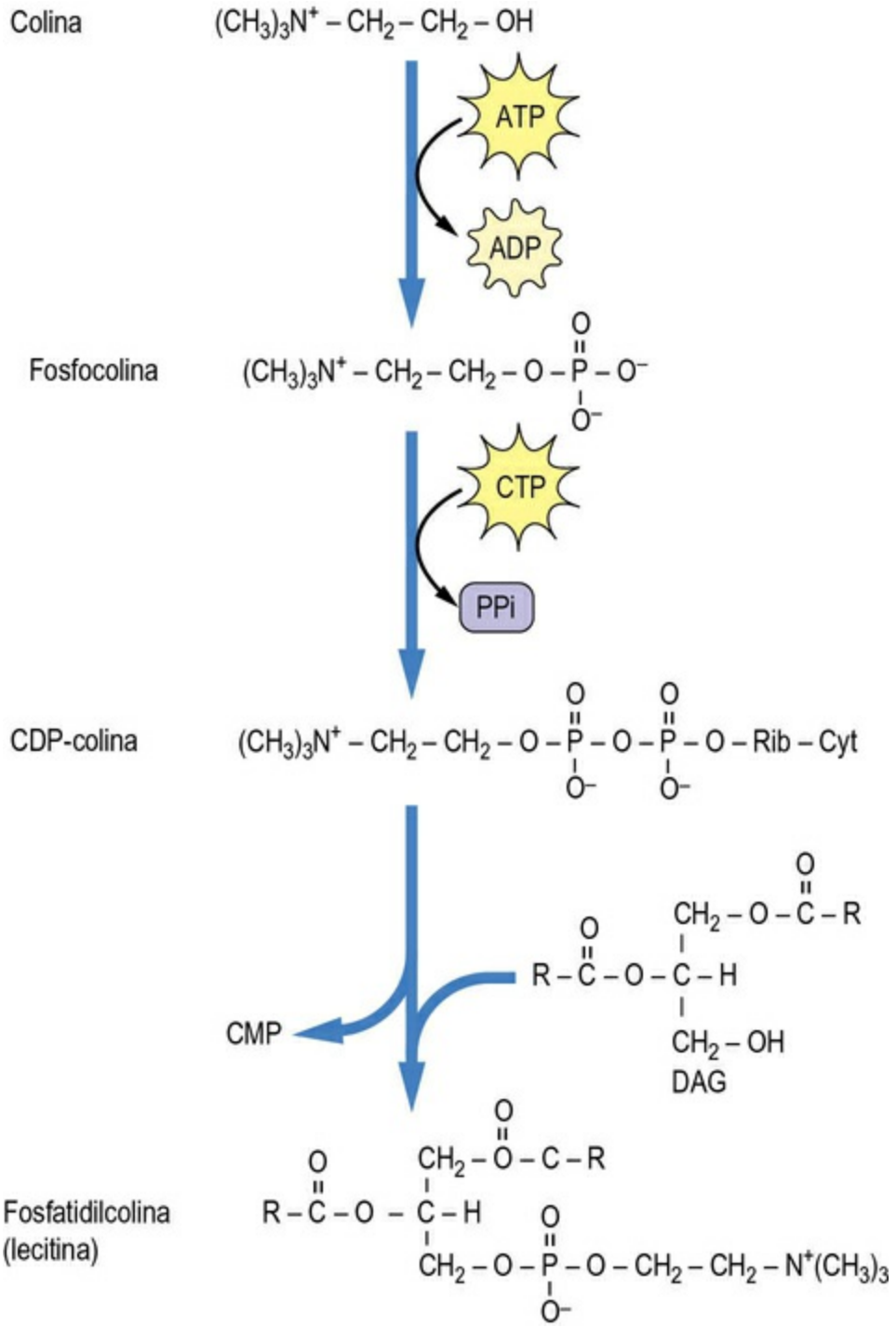


FIG. 28.2 Formação da fosfatidilcolina pela via CDP-colina.
Esta via é uma extensão do lado inferior esquerdo da Figura 28.1. Cyt, citosina; CDP, difosfato de citosina; CMP, monofosfato de citidina; DAG, diacilglicerol; Rib, ribose; CTP, trifosfato de citidina.

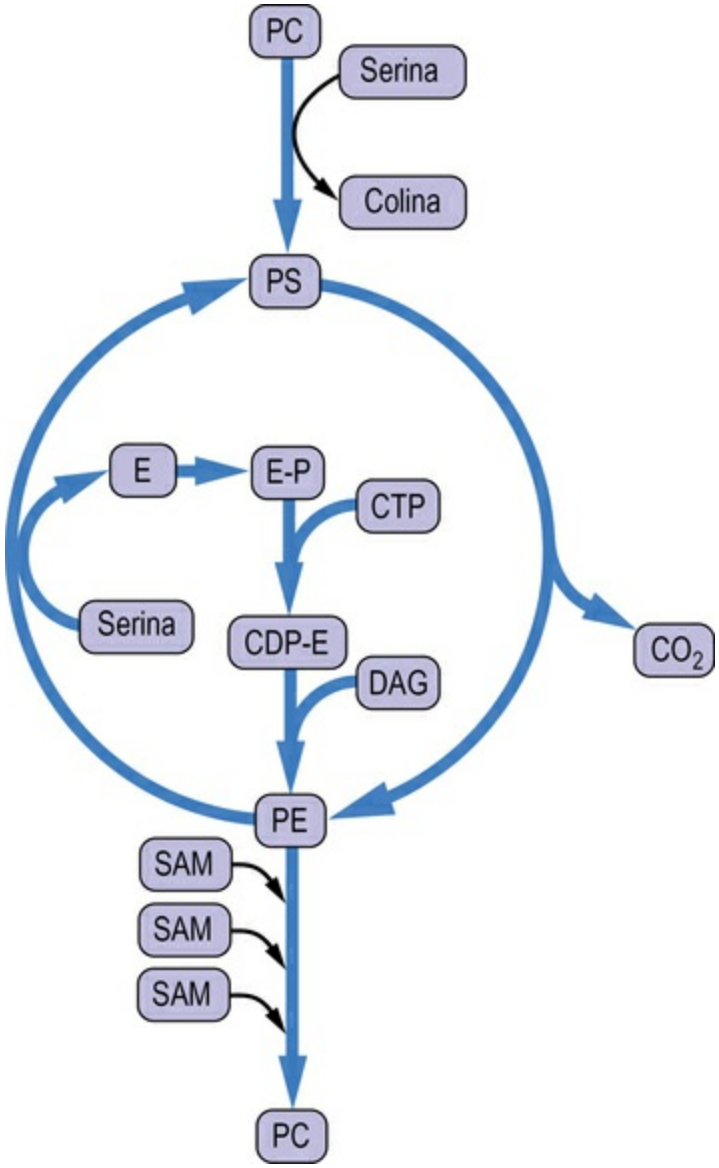


FIG. 28.3 Vias de interconversão de fosfolipídios pela troca de grupamentos cabeça, por metilação ou por descarboxilação.
CDP, difosfato de citosina; CTP, trifosfato de citidina; DAG, diacilglicerol; E, etanolamina; PC, fosfatidilcolina; PE, fosfatidiletanolamina; PS, fosfatidilserina; SAM, *S*-adenosilmetionina.

São necessárias grandes quantidades de PC no fígado para a biossíntese hepática de lipoproteínas e de bile. Em uma via secundária que, no fígado em situações de jejum prolongado, é um suplemento necessário à via CDP-colina acima descrita, a PC pode também ser formada por metilação da PE com o doador de metila ***S*-adenosilmetionina (SAM)** (Figs. 28.3 e 28.4). Essa via de metilação envolve a transferência sequencial de três grupos metila ativados a partir de três moléculas de SAM. A PE usada nesta via é fornecida a partir da PS por uma descarboxilase mitocondrial específica (Fig. 28.3).

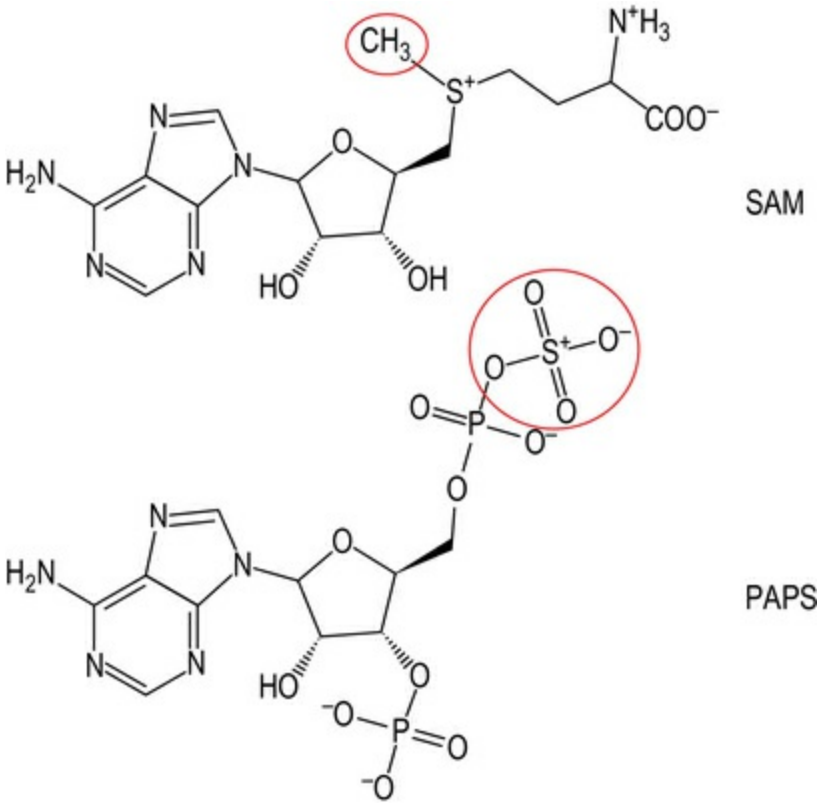


FIG. 28.4 Estruturas de doadores de metil e sulfato envolvidos na síntese de lipídios de membrana. SAM, *S*-adenosilmetionina; PAPS, 3'-fosfoadenosina-5'-fosfossulfato (sulfato ativo).

A PS e outros fosfolipídios com um grupo álcool em sua cabeça, por exemplo o fosfatidilglicerol (PG) e o fosfatidilinositol (PI), são sintetizados por uma via alternativa. Neste caso, a PA é ativada pelo CTP, originando CDP-DAG (ver Fig. 28.5); o grupo PA é então transferido para a serina, glicerol ou inositol livre, para formar PS, PG ou PI, respectivamente. Um segundo PA também pode ser adicionado ao fosfatidilglicerol para formar o 1,3-difosfatidilglicerol (DPG). Este lipídio, conhecido como **cardiolipina,** é encontrado quase exclusivamente no interior da membrana mitocondrial; ele representa cerca de 20% dos fosfolipídios nas mitocôndrias cardíacas e é requerido para a atividade eficaz dos complexos III e IV, transportadores de elétrons, e a ATP:ADP translocase.

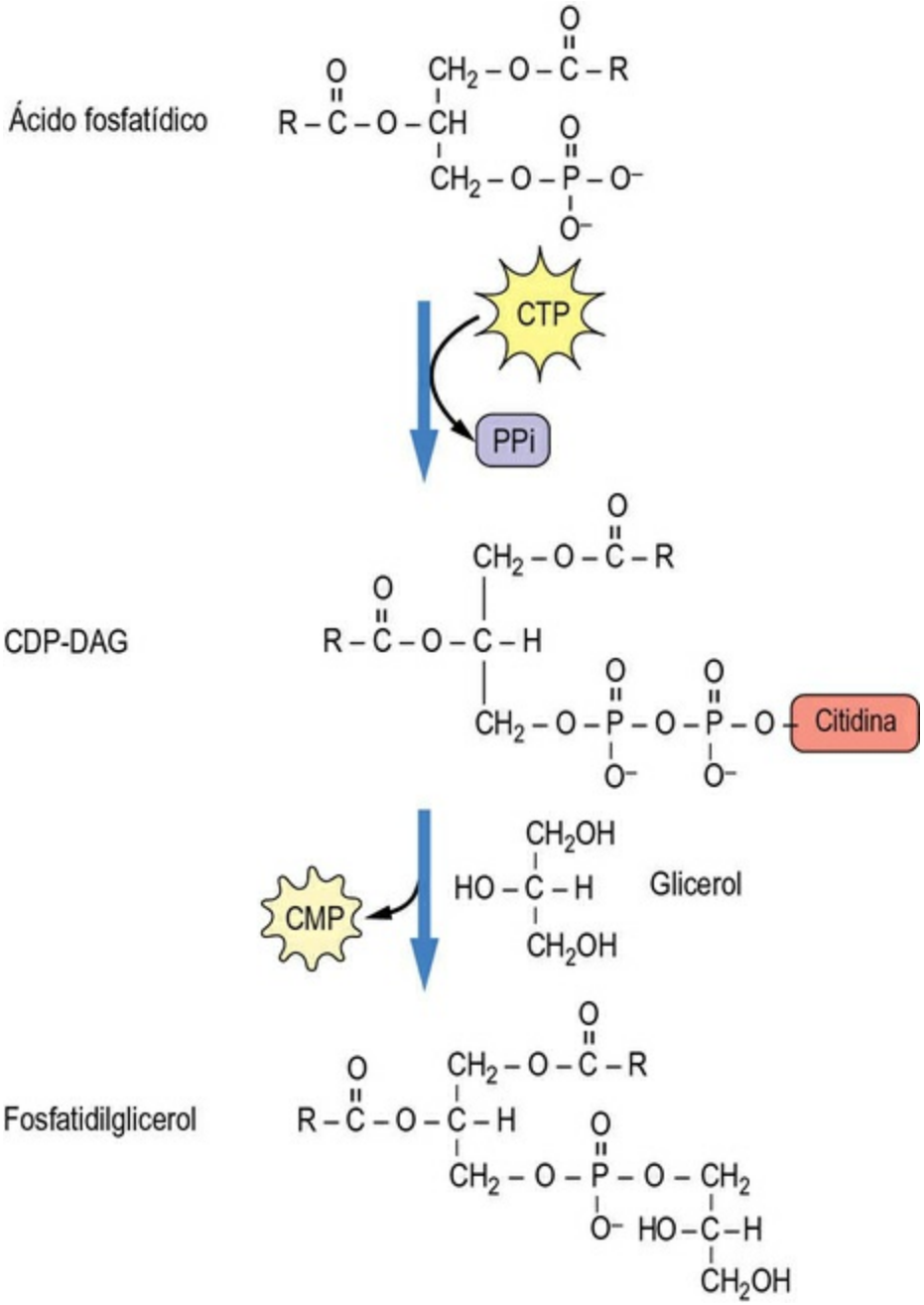


FIG. 28.5 Formação de fosfatidilglicerol pela ativação de ácido fosfatídico para formar CDP-DAG, e transferência do DAG ao glicerol.
Esta via é uma extensão do lado inferior direito da Figura 28.1. CMP, monofosfato de citidina; CTP, trifosfato de citidina.

Os **plasmalogênios** são a segunda maior classe de lipídios mitocondriais, e estão em grandes quantidades em nervos e tecido muscular; no coração, podem somar cerca de 50% do total de fosfolipídios. A biossíntese de plasmalogênios procede do DHAP: ele é primeiro acetilado no C-1; em seguida, o grupamento acil permuta com um álcool de lipídio para formar um lipídio tipo éter. O éter lipídico é dessaturado, conduzindo possivelmente a um 1-alceniléter-2-acil-fosfolipídio. A função dos plasmalogênios *versus* os diacilfosfolipídios ainda não está clara, mas existem algumas evidências de que sejam mais resistentes ao dano oxidativo, podendo promover proteção contra o estresse oxidativo nos tecidos com metabolismo aeróbico ativo (Cap. 37).

Via de remodelação

Os grupos acila dos glicerofosfolipídios são altamente diversos e distribuídos de forma assimétrica entre a posição *sn*-1 e *sn*-2 do glicerol; os ácidos graxos polinsaturados, como o araquidonato, encontram-se predominantemente na posição *sn*-2. A composição dos grupos de ácidos graxos nos fosfolipídios também varia entre tecidos e membranas, e de acordo com a natureza do grupamento cabeça: colina, etanolamina, serina, inositol ou glicerol. A diversidade e assimetria dos fosfolipídios não são explicadas pela via *de novo*, uma vez que o ácido fosfatídico e o DAG são precursores comuns tanto dos triglicerídios quanto dos fosfolipídios. Em vez disso, a redistribuição dos ácidos graxos nos fosfolipídios é conseguida por vias de remodelação, através da ação concertada da fosfolipase A_2 (PLA_2) e das lisofosfolipídio aciltransferases (LPLAT), que removem, substituem e, no processo, redistribuem os ácidos graxos nos fosfolipídios. As enzimas LPLAT não haviam sido identificadas até a última década; elas desempenham um papel essencial na (re)incorporação de ácidos graxos polinsaturados em fosfolipídios.



Quadro clínico

Função do surfactante de fosfolipídios: a síndrome da insuficiência respiratória aguda (SARA)

A síndrome da insuficiência respiratória aguda (SARA) é responsável por cerca de 15-20% da mortalidade neonatal em países do Ocidente. Essa doença afeta crianças prematuras, e sua incidência é diretamente relacionada ao grau de prematuridade.

Comentário

Os pulmões imaturos não têm células epiteliais tipo II suficientes para sintetizar o conteúdo de fosfolipídios, **dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC).** Esses fosfolipídios constituem mais de 80% dos fosfolipídios totais da camada de lipídio extracelular que recobre os alvéolos de pulmões normais. A DPPC diminui a tensão de superfície da camada superficial aquosa dos pulmões, facilitando a abertura dos alvéolos durante a inspiração. A deficiência de surfactante causa o colapso dos pulmões durante a fase de expiração da respiração, levando à SARA. A maturidade do pulmão fetal pode ser avaliada por mensuração da razão lecitina: esfingomielina no líquido amniótico. Se houver um problema em potencial, a mãe poderá ser tratada com um glicocorticoide para acelerar a maturação do pulmão fetal. A SARA também é vista em adultos cujas células epiteliais tipo II foram destruídas como resultado do uso de fármacos imunossupressores ou certos agentes quimioterápicos.

Turnover de fosfolipídios

Os fosfolipídios estão em um estado contínuo de *turnover* na maioria das membranas. Isso ocorre como resultado do dano oxidativo, durante a inflamação, e com a ativação de fosfolipases, particularmente em resposta ao estímulo hormonal. Como mostrado na Figura 28.6, existem várias fosfolipases que atuam em ligações específicas nas estruturas

fosfolipídicas. As fosfolipases A2 (PLA2) e C (PLC) são particularmente ativas durante a resposta inflamatória e nas transduções de sinais. A fosfolipase B (não mostrada) é uma lisofosfolipase que remove o segundo grupamento acil após ação da PLA1 ou PLA2. Os lisofosfolipídios podem ser degradados ou reciclados (reacilados).

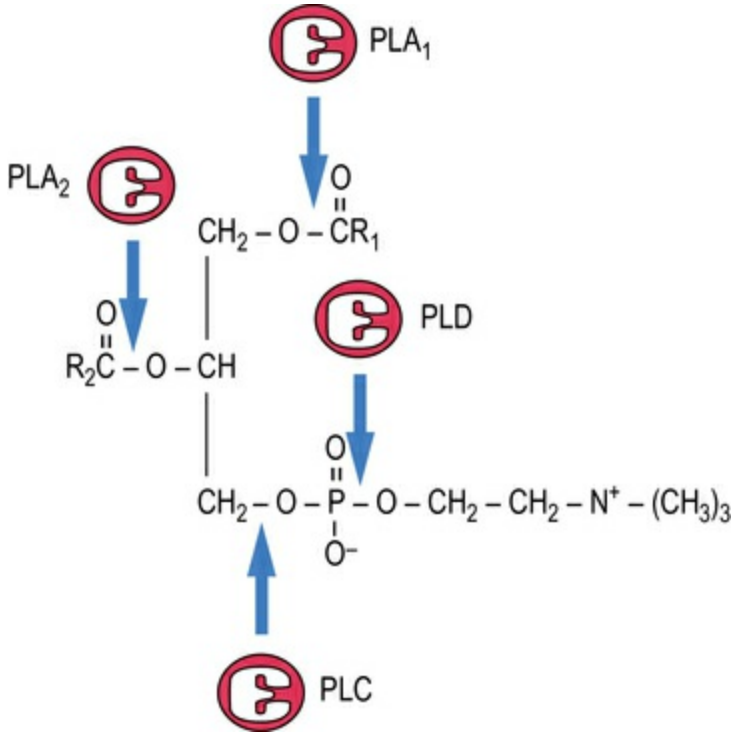


FIG. 28.6 Locais de ação de fosfolipases na fosfatidilcolina.
PLA_1, PLA_2, PLC, PLD são fosfolipases A_1, A_2, C e D, respectivamente.

Quadro de conceitos avançados

Âncoras de membrana: glicosilfosfatidilinositol

O fosfatidilinositol é um componente integral da estrutura glicosilfosfatidilinositol (GPI), que ancora várias proteínas da membrana plasmática (Fig. 28.7). Em contrapartida com outros fosfolipídios de membrana, incluindo a maioria dos fosfatidilinositol de membrana, o GPI tem uma cadeia glicana contendo glicosamina e manose aderidos ao inositol. A etanolamina conecta o GPI-glicano ao carboxiterminal da proteína. Muitas proteínas de membrana de células eucarióticas são ancoradas por uma estrutura GPI, incluindo a fosfatase alcalina e a acetilcolinesterase, as quais possuem importante papel na mineralização óssea e transmissão nervosa, respectivamente. Diferentemente das proteínas integrais ou periféricas de membrana, as proteínas ancoradas por GPI podem ser liberadas da superfície celular pela fosfolipase C em resposta a processos regulatórios.

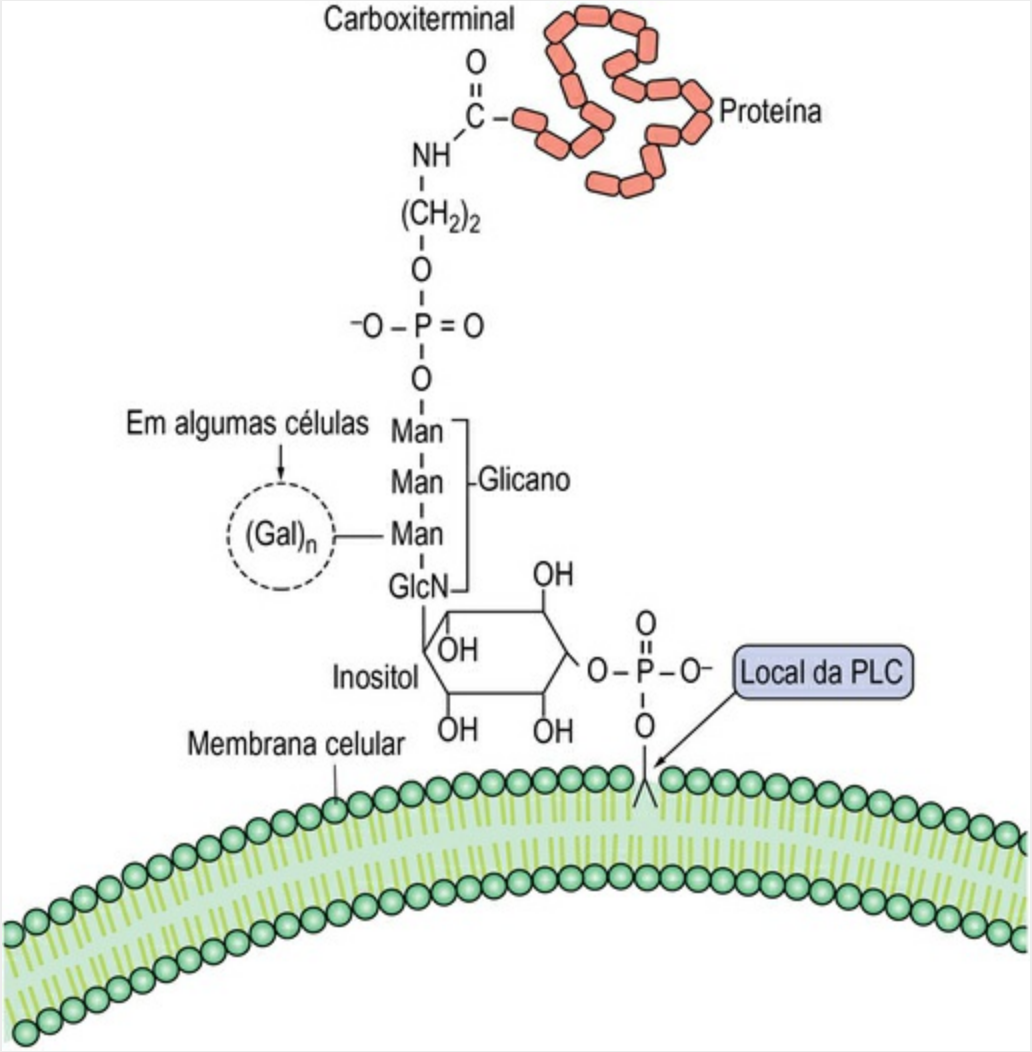


FIG. 28.7 Estrutura da âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) e sua adesão às proteínas. Gal, galactose; GlcN, glicosamina; Man, manose; PLC, fosfolipase C.

Esfingolipídios

Estrutura e biossíntese de esfingosina

Os esfingolipídios são um grupo complexo de lipídios anfipáticos e polares. Eles são formados em uma estrutura central de cadeia longa de amino álcool esfingosina, que é formada por uma descarboxilação oxidativa e por condensação de palmitato com serina. Em todos os esfingolipídios, o ácido graxo de cadeia longa é aderido ao grupamento amino da esfingosina em uma ligação amida (Fig. 28.8). Em razão da estabilidade alcalina das amidas, comparada aos ésteres, os esfingolipídios são insaponificáveis, o que facilita sua separação dos gilcerolipídios álcali lábeis.

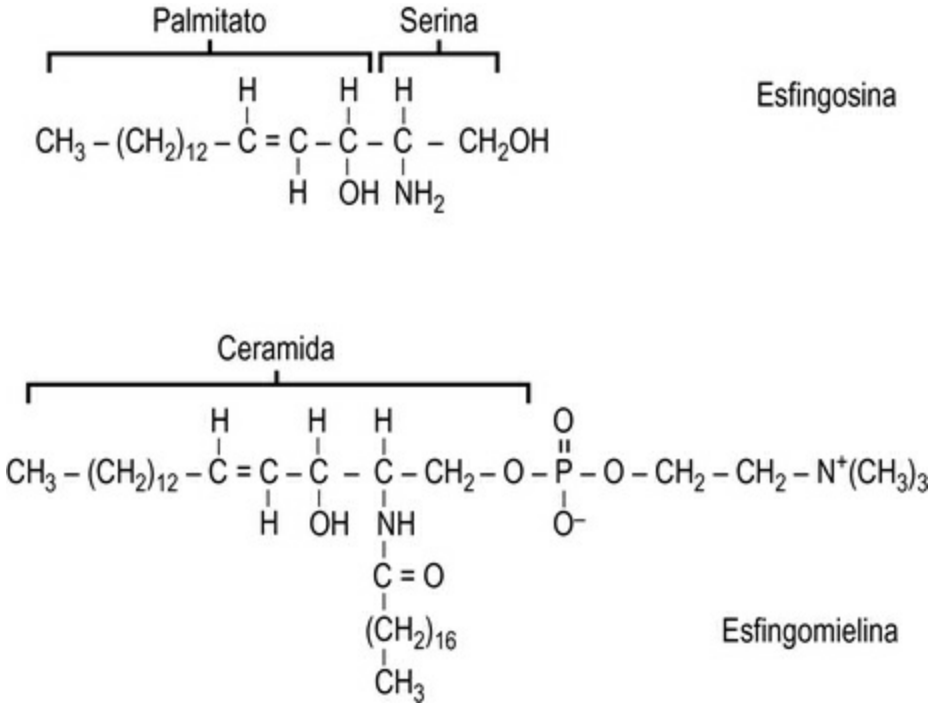


FIG. 28.8 Estruturas da esfingosina e esfingomielina.

A síntese da esfingosina, base dos esfingolipídios, envolve a condensação do palmitoil-CoA com uma serina, na qual o carbono-1 da serina é perdido como dióxido de carbono. O produto dessa reação é convertido em várias etapas em esfingosina, que é então N-acetilada para formar ceramida (N-acilesfingosina). A ceramida (Fig. 28.9) é a precursora e a estrutura dorsal de ambos, esfingomielina e glicoesfingolipídios.

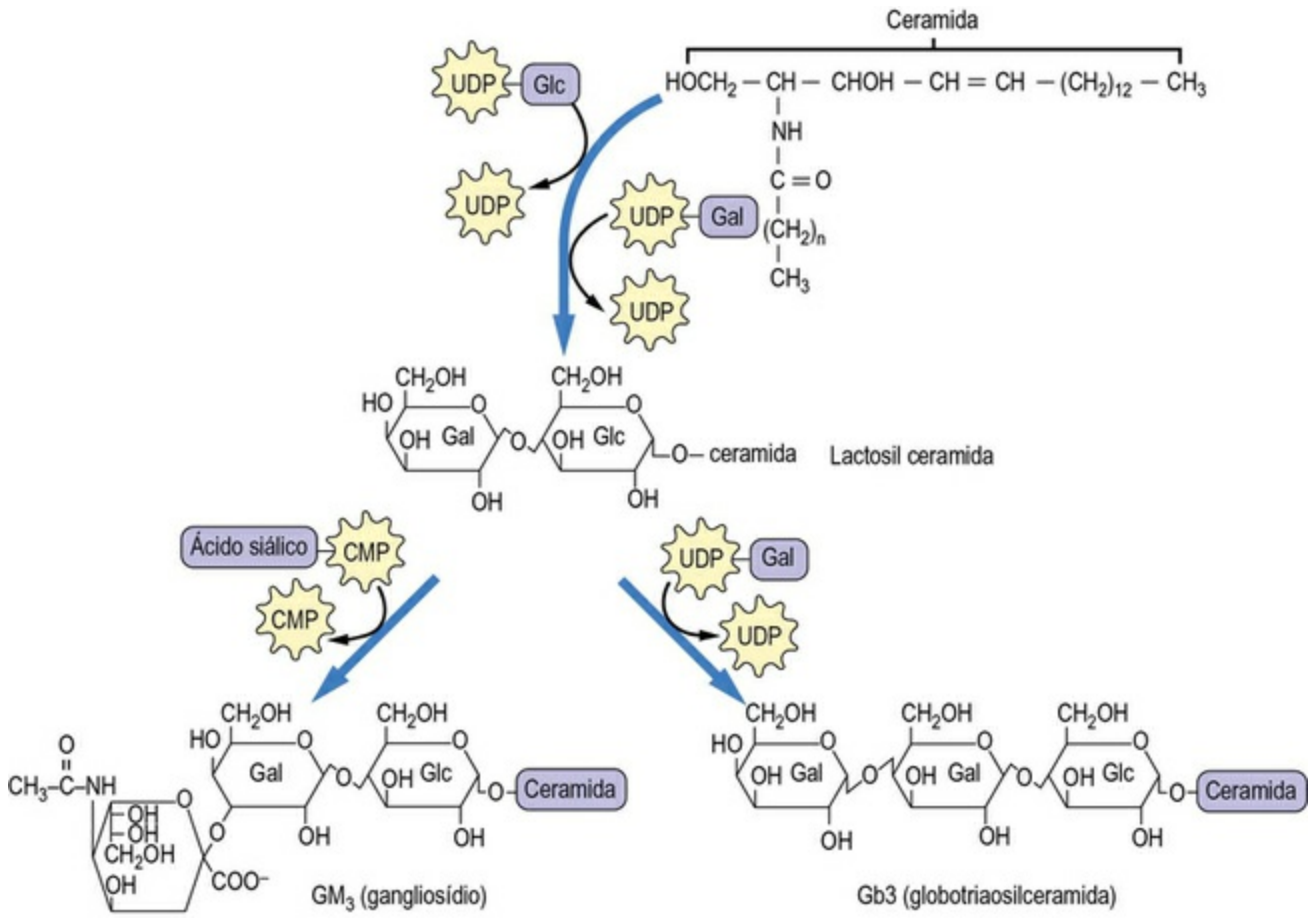


FIG. 28.9 Um esboço das reações das transferases para elongação dos glicolipídios e formação dos gangliosídios.

Esfingomielina

A esfingomielina é o único esfingolipídio que contém fosfato, e é o maior fosfolipídio na bainha de mielina dos nervos

A esfingomielina (Fig. 28.8) é encontrada nas membranas plasmáticas, organelas subcelulares, retículo endoplasmático e mitocôndrias. Ela compreende cerca de 5-20% dos fosfolipídios totais na maioria dos tipos celulares, e é maioritariamente localizada na membrana plasmática. O grupamento fosfocolina na esfingomielina é transferido para o grupamento hidroxil terminal da esfingosina, por uma reação de transesterificação com uma fosfatidilcolina. A composição de ácidos graxos varia, mas os ácidos graxos de cadeia longa são mais comuns, incluindo os ácidos lignocérico (24:0), cerebrônico (2-hidroxilignocérico) e nervônico (24:1).

Quadro de conceitos avançados

Antígenos de superfície variável de tripanossomas

O parasita tripanossoma que causa a doença do sono, o *Tripanosoma brucei*, tem uma proteína chamada antígeno de superfície variável ligada à sua superfície celular por uma âncora de GPI. Este antígeno de superfície variável desencadeia a formação de

anticorpos específicos no hospedeiro, e estes anticorpos podem atacar e matar o parasita. Entretanto, alguns dos parasitas invadem a barreira imune por desprender este antígeno, como se eles fossem uma camada removível.

Comentário

Os tripanossomas e alguns outros patógenos são capazes de desprender seus antígenos de superfície porque têm uma enzima, a fosfolipase C, que cliva a âncora de GPI na ligação fosfato-diacilglicerol, liberando o componente proteína-glicano no líquido externo. As células sobreviventes rapidamente fazem uma nova cobertura com uma estrutura antigênica diferente que não será reconhecida pelo anticorpo. Com certeza, essa nova cobertura desencadeará a formação de novos anticorpos específicos, mas o parasita pode desprender sua cobertura novamente, e então, em uma sequência randômica, invadir o sistema imune hospedeiro.



Quadro clínico

Defeitos na ancoragem de gpi em células hematopoiéticas: hemoglobinúria noturna paroxismal

A hemoglobinúria noturna paroxismal (PNH) é uma disfunção hematológica complexa caracterizada por anemia hemolítica, tromboses venosas em locais pouco comuns e hematopoiese deficiente. O diagnóstico da doença é baseado em uma incomum suscetibilidade das hemácias à ação hemolítica do complemento (Cap. 38), porque as hemácias de pacientes com PNH são carentes de várias proteínas envolvidas na regulação da ativação do complemento na superfície celular.

Comentário

Uma dessas proteínas de superfície celular é o fator acelerador *decay*, uma proteína ancorada por GPI que inativa o complexo hemolítico formado durante a ativação do complemento; na sua ausência, há aumento de hemólise. A PNH é uma doença genética adquirida devido a um defeito de mutação das células-tronco hematopoiéticas. Uma dessas mutações envolve um defeito na GlcNAc transferase que adiciona *N*-acetilglicosamina ao motivo inositol do fosfatidilinositol, o primeiro passo na formação da âncora de GPI (Fig. 28.7).

Glicolipídios

Os esfingolipídios contendo açúcares covalentemente ligados são conhecidos como glicoesfingolipídios ou glicolipídios. Assim como os glicoconjugados em geral, a estrutura das cadeias oligossacarídeas é bastante variável. Além disso, a distribuição da glicosiltransferase e do conteúdo de glicoesfingolipídios das células varia durante o desenvolvimento e em resposta aos processos regulatórios.

Os glicolipídios podem ser classificados em três principais grupos: glicolipídios

neutrais, **sulfatídios** e gangliosídios. Em todos esses componentes, o grupamento cabeça polar, incluindo os açúcares, é unido à ceramida por uma ligação glicosídica no grupamento hidroxil terminal da esfingosina. A Figura 28.9 ilustra a estrutura e a biossíntese de alguns dos glicolipídios mais simples. Os glicolipídios neutrais contêm açúcares neutros e amino. A glicosilceramida (GlcCer) e a galactosilceramida (GalCer) são os menores membros desta classe de compostos e funcionam como núcleo para a elaboração de estruturas mais complexas. Os sulfatídios são formados pela adição de sulfato por um doador de sulfato, o **3′-fosfoadenosina-5′-fosfossulfato (PAPS)** (Fig. 28.4), rendendo, por exemplo, GalCer-3-sulfato. Finalmente, os glicolipídios contendo ácido siálico (ácido *N*-acetilneuramínico, NeuAc) são denominados gangliosídios.

Estrutura e nomenclatura dos gangliosídios

Os gangliosídios são glicoesfingolipídios contendo ácido siálico (*N*-acetilneuramínico)

O termo "gangliosídio" se refere a glicolipídios que foram originalmente identificados em altas concentrações nas células ganglionares do sistema nervoso central. Em geral, mais de 50% do ácido siálico presente nas células está nos gangliosídios. Os gangliosídios também são encontrados nas superfícies de membrana das células da maioria dos tecidos extraneurais, mas nesses tecidos eles contêm menos que 10% do ácido siálico total.

A nomenclatura usada para identificar os vários gangliosídios é baseada no número de resíduos de ácido siálico contidos na molécula e na sequência de carboidratos (Fig. 28.10). GM se refere ao gangliosídio com um único ácido siálico (mono), enquanto GD, GT e GQ podem indicar dois, três e quatro resíduos de ácido siálico na molécula, respectivamente. O número depois de GM, por exemplo GM_1, se refere à estrutura do oligossacarídio. Estes números foram derivados da mobilidade relativa dos glicolipídios em cromatogramas de camada fina; o maior dos gangliosídios, GM_1, migra mais lentamente.

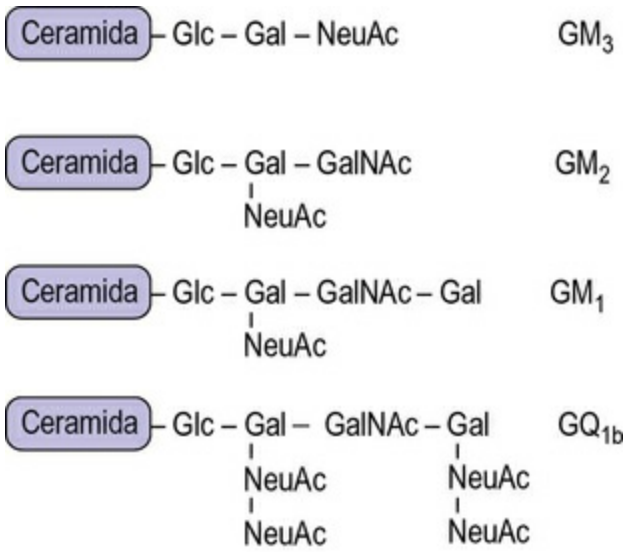


FIG. 28.10 Estruturas gerais dos gangliosídios.
Glc, glicose; Gal, galcatose; NeuAc, ácido *N*-acetil neuramínico; GalNAc, *N*-acetil galactosamina.

Quadro clínico

Cerebrosidoses e gangliosidoses

A **doença de Tay-Sachs** é uma gangliosidose na qual o gangliosídio GM_2 se acumula como resultado de uma ausência de hexosaminidase A (Fig. 28.11). Os indivíduos com essa doença têm geralmente retardo mental e cegueira, e morrem entre o segundo e o terceiro ano de vida. A **doença de Fabry** é uma esfingolipidose resultante da deficiência de α-galactosidase e acúmulo de globotriaosilceramida (Gb3) (Tabela 28.1). Os sintomas da doença de Fabry são erupções na pele, falha dos rins e dor nas extremidades inferiores. Pacientes com essa condição se beneficiam com transplantes renais e geralmente vivem do início ao meio da vida adulta. A maioria dessas doenças de armazenamento lisossomal aparece de várias formas (variantes), resultantes de diferentes mutações no genoma. Algumas doenças de armazenamento lisossomal e algumas variantes são mais graves e debilitantes do que outras. Embora as doenças de armazenamento lisossomal sejam relativamente raras, elas têm um impacto maior sobre a nossa compreensão da função e importância dos lisossomos.

Tabela 28.1

Algumas doenças de armazenamento de lipídios

Doença	Sintomas	Produto armazenado mais importante	Enzimas deficiente
Tay-Sachs	Cegueira, retardo mental, morte entre o 2° e 3° ano	GM_2 gangliosídio	Hexosaminidase A
Gaucher	Fígado e baço aumentados, retardo mental na infância	Glicocerebrosídio	β-glicosidase
Fabry	Erupções na pele, falha renal, dor nas extremidades inferiores	Ceramida triexosídio	α-galactosidase
Krabbe	Fígado e baço aumentados, retardo mental	Galactocerebrosídio	β-galactosidase

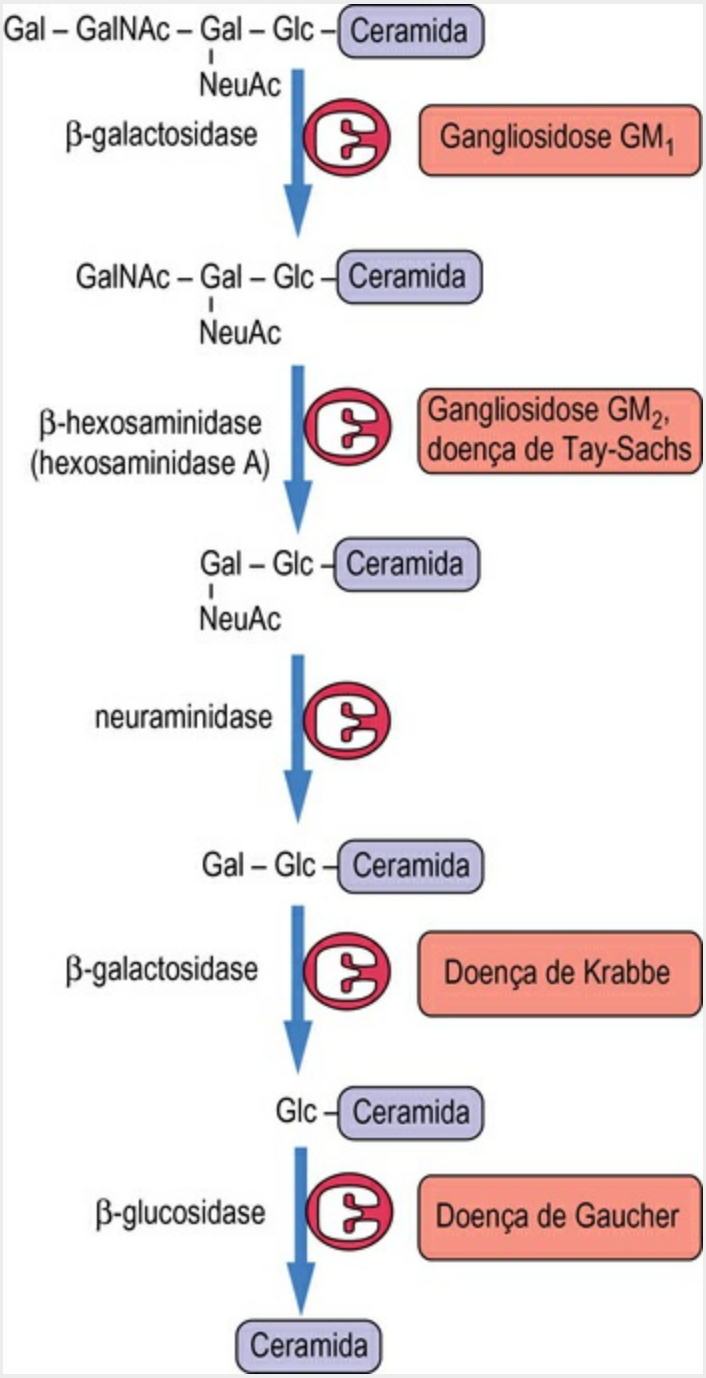


FIG. 28.11 Via lisossomal de *turnover* (degradação) de gangliosídio GM1 em células humanas. Várias enzimas podem estar ausentes em doenças de armazenamento de lipídios específicas, como indicado na Tabela 28.1. Gal, galactose; GalNAc, *N*-acetil galactosamina; Glc, glicose; NeuAc, ácido *N*-acetil neuramínico.

Comentário

Quando as células morrem, as biomoléculas, incluindo glicoesfingolipídios e glicoproteínas, são degradadas aos seus componentes individuais. A Figura 28.11 apresenta a via de degradação de um gangliosídio, como o GM_1 nos lisossomos. Diversas doenças lisossomais resultam da ausência de uma glicosidase essencial (Tabela 28.1). As esfingolipidoses são caracterizadas por acúmulo lisossomal do substrato da enzima ausente, interferindo com a função lisossomal normal no *turnover* de biomoléculas.

Doenças do armazenamento lisossomal resultante de defeito na degradação de glicolipídios

Os oligossacarídios complexos nos glicolipídios são montados com um resíduo de açúcar de cada vez no aparelho de Golgi e são degradados de maneira similar, passo a passo, por uma série de exoglicosidases nos lisossomos (Fig. 28.11). Defeitos na degradação sequencial dos glicolipídios levam a uma série de **doenças de armazenamento lisossomal,** conhecidas como esfingolipidoses e gangliosidoses (Tabela 28.1). Essas doenças são hereditárias autossômicas recessivas. Os heterozigotos são assintomáticos, indicando que uma única cópia do gene para uma enzima funcional é suficiente para um *turnover* aparentemente normal de glicolipídios. Como na doença de célula-I (Cap. 27), as esfingolipidoses são caracterizadas pelo acúmulo de material não digerido em corpos de inclusão nas células.



Quadro clínico

Doença de gaucher: um modelo para a terapia de reposição enzimática

A doença de Gaucher é a doença de armazenamento lisossomal na qual os indivíduos atingidos têm deficiência da enzima β-glicosidase (também conhecida como glicocerebrosidase). Essa enzima remove o açúcar final da ceramida, permitindo que a porção de lipídios seja posteriormente degradada nos lisossomos. A doença é caracterizada por hepatomegalia e neurodegeneração, mas existem variantes brandas que são aceitas para o tratamento por terapia de reposição enzimática.

Para o tratamento da doença de Gaucher, a β-glicosidase exógena foi direcionada, com sucesso, aos lisossomos de macrófagos. A fim de realizar isso, foi necessário produzir uma enzima recombinante de reposição com cadeias *N*-glicano contendo resíduos terminais de manose. Isso foi feito clivando-se os glicanos da enzima produzida nas células de mamíferos com uma combinação de sialidase (neuraminidase), β-galactosidase e β-hexosaminidase para clivar as cadeias complexas no centro da manose. Uma glicosidase recombinante alternativa foi produzida em sistema de células de inseto infectadas por baculovírus. Ambas as enzimas têm um oligossacarídio rico em manose; embora não contenham resíduos de Man-6-P, são reconhecidas por um receptor de superfície celular de macrófagos para oligossacarídios ricos em manose; as enzimas são endocitadas e acabam no compartimento lisossomal, onde hidrolisam a glicosilceramida. As enzimas recombinantes são administradas intravenosamente. O sucesso no uso de glicocerebrosidase recombinante para o tratamento da doença de Gaucher estimulou o desenvolvimento de outras hidrolases lisossomais para o tratamento de doenças de sobrecarga lisossomal.

Antígenos do grupo sanguíneo ABO

Transfusões sanguíneas repõem a capacidade de o sangue carrear oxigênio nas pessoas que sofreram perda de sangue ou anemia (Cap. 5). O termo **"transfusão sanguínea"** é um tanto equivocado, porque envolve somente a infusão de hemácias lavadas e preservadas. As membranas das hemácias contêm vários grupamentos antígenos do sangue, dos quais o sistema do grupo sanguíneo ABO é o mais compreendido e estudado.



Quadro clínico

Doença de fabry (incidência 1 em 100.000)

Um homem de 30 anos apresentou proteinúria em seu exame médico. Ele tem sido examinado há muito tempo, desde cerca dos 10 anos, com dores de cabeça, vertigem e dor aguda em seus braços e pernas. Nenhum diagnóstico foi feito, e ele cresceu acostumado com esses problemas. Um médico examinou cuidadosamente seu períneo e escroto, identificando angioqueratoma pequeno, elevado e vermelho.

Comentário

Esse homem foi diagnosticado com doença de Fabry, que geralmente leva anos até que o diagnóstico seja confirmado por dosagem da atividade da α-galactosidase A. As principais deposições endoteliais de um ceramida triexosídio (Gal-α1-4-Gal-β1-4-Glc-β-ceramida; Gb3) ocorrem nos rins (levando à proteinúria e falência renal), no coração e cérebro (levando ao infarto agudo do miocárdio e a um acidente vascular cerebral), e em torno dos vasos sanguíneos que suprem os nervos (levando a uma dolorosa parestesia). Historicamente, a maioria dos pacientes experimentava doença renal terminal, requerendo transplantação. No entanto, a terapia de substituição com enzimas recombinantes parece remover a Gb3 depositada, e estudos iniciais sugerem que a função renal é mantida.

Os antígenos do grupo sanguíneo ABO são carboidratos complexos presentes como componentes de glicoproteínas ou glicoesfingolipídios de membranas das hemácias (Fig. 28.12). O *lócus* H codifica uma fucosiltransferase, a qual adiciona fucose a um resíduo de galactose em uma cadeia de glicana. Indivíduos com sangue tipo A têm, além da substância H, um gene A que codifica uma GalNAc transferase específica que adiciona GalNAc α1,3 ao resíduo de galactose da **substância H** para formar o antígeno A. Indivíduos com sangue tipo B têm um gene que codifica a galactosil transferase, que adiciona α1,3 ao resíduo de galactose da substância H, para formar o antígeno B. Indivíduos com sangue tipo AB têm ambas, a GalNAc e a Gal transferase, e suas hemácias contêm uma mistura das substâncias A e B. Aqueles com sangue tipo O têm somente a substância H nas membranas das hemácias; eles não fazem qualquer enzima. Enzimas como as α-galactosidase do grão de café podem remover a galactose das hemácias do tipo B, um caminho que está sendo testado para aumentar o suprimento de hemácias tipo O (doador universal).

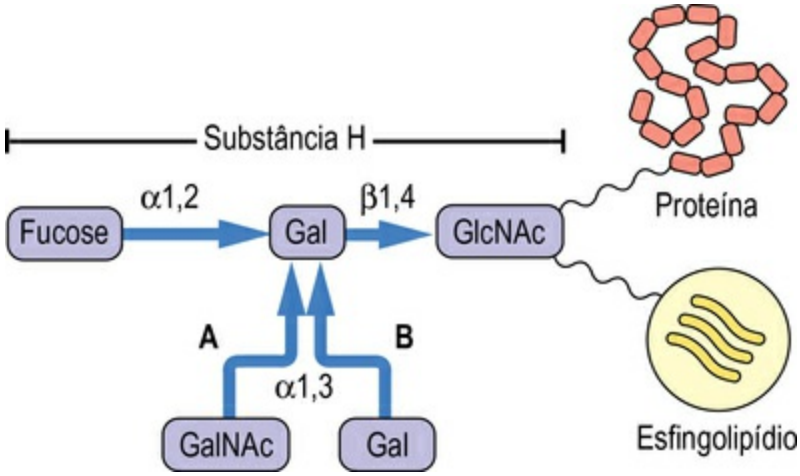


FIG. 28.12 Relação entre as substâncias H, A e B dos grupos sanguíneos. O oligossacarídio terminal é ligado por meio de outros açúcares a proteínas e lipídios das membranas das hemácias. GlcNAc, *N*-acetil glicosamina; GalNAc, *N*-acetil galactosamina; Gal, galactose.

Um indivíduo pode ter sangue tipo A, tipo B, tipo AB ou tipo O. Indivíduos com células do tipo A desenvolvem anticorpos naturais em seu plasma, que são direcionados contra eritrócitos do tipo B e do tipo AB, aglutinando-os; aqueles com eritrócitos do tipo B desenvolvem anticorpos contra a substância A e irão aglutinar sangue tipo A e tipo AB. Pessoas com sangue tipo AB não possuem anticorpos A nem B e são denominadas **"receptores universais",** uma vez que podem ser transfundidas com células de qualquer um dos tipos de sangue. Indivíduos com sangue tipo O possuem apenas substância H em seus eritrócitos, e não substância A ou B, e são **"doadores universais",** já que seus eritrócitos não são aglutinados por anticorpos A ou B; no entanto, eles podem aceitar sangue somente de um doador, ou seja, do tipo O.

Os antígenos ABO estão presentes na maioria das células do corpo, mas são associados aos grupos antigênicos do sangue por causa de sua associação de reações de transfusão. A reação de transfusão é resultado da reação dos anticorpos do hospedeiro com as hemácias transfundidas, resultando em hemólise mediada pelo complemento (Cap. 38). Enquanto a reação de transfusão demonstra o papel dos carboidratos no reconhecimento de hemácias estranhas, a função fisiológica das substâncias do grupo sanguíneo não é clara. Pessoas com um genótipo O são geralmente tão saudáveis quanto aquelas com genótipo A ou B. Entretanto, existe alguma evidência que fenótipos específicos podem conferir resistência diferencial à doença; por exemplo, pessoas com sangue tipo A e O parecem ser mais suscetíveis à varíola e à cólera, respectivamente.

Outras substâncias dos grupos sanguíneos

Os antígenos do **grupo sanguíneo Lewis** correspondem a um grupo de estruturas glicanas fucosiladas. O antígeno Lewis A (Lewis^a) é sintetizado pela fucosiltransferase, que transfere um resíduo de fucose ao resíduo de GlcNAc na cadeia glicana (Fig. 28.13); enquanto o antígeno Lewis^b é sintetizado pela ação associada de uma segunda fucosiltransferase, a qual transfere a fucose ao resíduo de galactose na mesma cadeia glicana. Note a similaridade dessas estruturas com o antígeno sialil Lewis-X na

Figura 27.9 e os antígenos ABO na Figura 28.12. Existem 13 fucosiltransferases no genoma humano. As mudanças na fucosilação dos glicanos são associadas à diferenciação, desenvolvimento, carcinogênese e metástase.

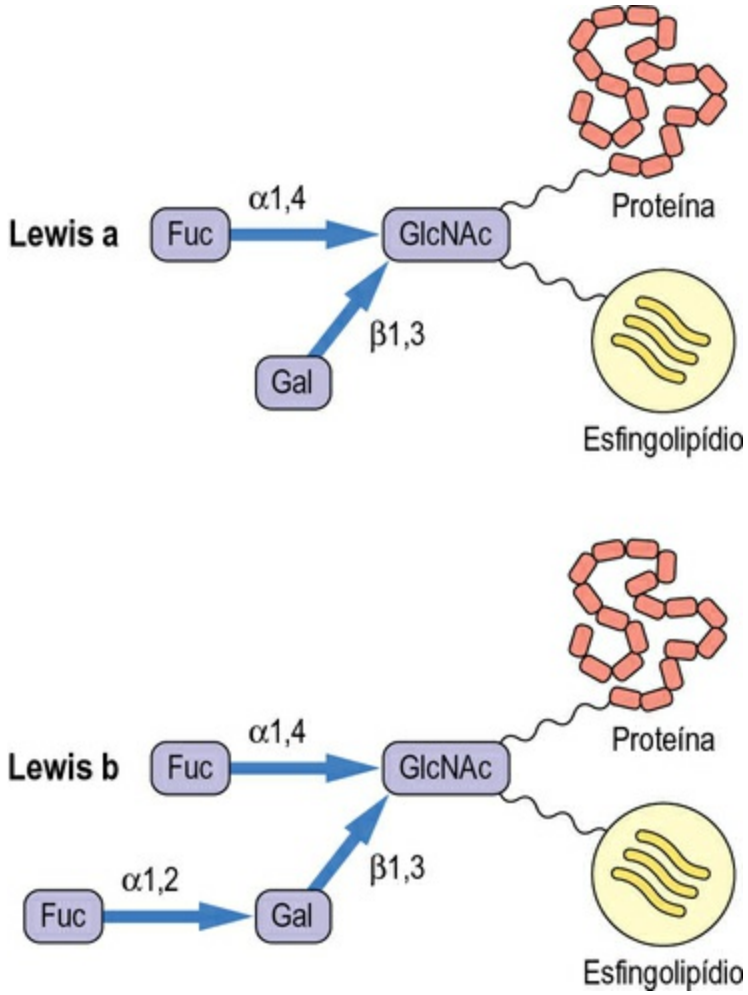


FIG. 28.13 Estrutura dos antígenos do grupo sanguíneo de Lewis.

Quadro de conceitos avançados

Glicolipídios são locais ligantes para bactérias e toxinas bacterianas

As bactérias são envolvidas por proteínas chamadas adesinas, que reconhecem e interagem com estruturas de carboidratos específicos nos glicolipídios, glicoproteínas e até nos proteoglicanos. Muitas dessas adesinas bacterianas são subunidades proteicas do pili, estruturas semelhantes a cabelo na superfície da bactéria. Os domínios de reconhecimento de carboidrato são geralmente localizados no ápice do pili. A maioria das bactérias também possui diferentes tipos de adesinas em sua superfície, cada uma contendo diferentes locais de reconhecimento de carboidratos, e essas adesinas definem os tipos de tecidos suscetíveis aos quais a bactéria pode se ligar, e os quais talvez possa invadir. Cada ligante de adesina individual é de baixa afinidade e a ligação é fraca, mas existem muitas cópias de uma dada adesina na superfície bacteriana e elas se agrupam; assim, a interação total é polivalente em vez

de monovalente, e a ligação torna-se bastante forte. A interação da adesina com seu receptor pode ativar a via de transdução do sinal e levar a eventos que são fundamentais para a colonização e talvez infecção. Diversas adesinas bacterianas almejam oligossacarídios contendo Galβ1,4Glc. Essa é a estrutura do dissacarídio que é encontrado no glicolipídio lactosilceramida, e sua estrutura pode estar presente como tal ou pode estar coberta com outros açúcares, como nos antígenos do grupo sanguíneo ABO. Porém, algumas bactérias secretam enzimas (glicosidases) que podem remover esses açúcares terminais para expor a estrutura da lactose para se ligar às suas adesinas. As células epiteliais do intestino grosso expressam lactosilceramida, enquanto as células de revestimento do intestino delgado não expressam esse glicolipídio. Como resultado, *Bacterioides, Clostridium, Escheria coli* e *Lactobacillus* colonizam somente o intestino grosso sob condições normais.

Além dos ligantes bacterianos, diversas toxinas que são secretadas pelas células bacterianas também se ligam a glicolipídios específicos. A mais bem estudada dessas toxinas é a toxina da cólera, isto é, a toxina produzida pelo *Vibrio cholerae*, a qual se liga ao GM_1. A toxina da *Shigella dysenteriae* também se liga às células do intestino grosso, mas ela reconhece um glicolipídio diferente, nesse caso Gb3. Esses dois exemplos mostram bem claramente como sutis mudanças nas estruturas das moléculas de carboidrato podem ser reconhecidas por diferentes proteínas, e porque a natureza selecionou moléculas de carboidratos como provedores de reconhecimento químico de informação. Existem outras toxinas, como a toxina tetânica produzida pelo *Clostridium tetani* ou a toxina botulínica pelo *Clostridium botulinum*, que também se ligam aos glicolipídios nas membranas das células nervosas. Essas toxinas reconhecem glicolipídios muito mais complicados. Por exemplo, a toxina tetânica se liga ao gangliosídio GT_{1b}.

Os antígenos do **grupo sanguíneo P** expressos na série globo glicoesfingolipídios são distribuídos nos eritrócitos e em outros tecidos. Novamente, os glicanos nesse grupo sanguíneo são sintetizados por uma ação sequencial de distintas glicosiltransferases. A função fisiológica dos grupos sanguíneos não é conhecida, mas os antígenos P estão associados às infecções no trato urinário e infecções por parvovírus. As linhagens uropatogênicas de *E. coli* expressam lecitinas que se ligam ao motivo de Galα1,4Gal dos antígenos Pk e P1. Mais estudos são necessários para compreender a genética e a bioquímica desses e outros antígenos dos grupos sanguíneos, bem como seus papéis na fisiologia e na doença.

Quadro clínico

Receptor de gangliosídio para toxina da cólera

Os glicolipídios contendo galactose nas membranas plasmáticas das células epiteliais intestinais são locais ligantes de bactérias. Os glicolipídios parecem ajudar

na retenção da flora intestinal normal (simbiontes) no intestino, mas inversamente, acredita-se que esses e outros glicolipídios ligantes de bactérias patogênicas facilitam a infecção das células epiteliais. A diferença entre as bactérias simbiontes e patogênicas depende, em parte, de sua capacidade de secretar toxinas ou de penetrar nas células do hospedeiro após reação de ligação.

As células da mucosa intestinal contêm gangliosídios GM_1 (Fig. 28.10). Esses gangliosídios servem como receptores, nos quais a toxina da cólera se liga em uma primeira etapa de sua penetração nas células intestinais. A toxina da cólera é uma proteína hexamérica secretada pela bactéria *Vibrio cholerae*. A proteína é composta de uma subunidade A e cinco subunidades B. A proteína se liga aos gangliosídios por múltiplas interações por meio das subunidades B, que habilitam a subunidade A a entrar na célula e ativar a adenilato ciclase na superfície interna da membrana. O AMP cíclico formado estimula então as células intestinais a exportar íons cloreto, levando a uma diarreia osmótica, desequilíbrio eletrolítico e desnutrição. **A cólera permanece ainda hoje como fator número um responsável por mortes de crianças em todo o mundo.**

Resumo

- Os lipídios polares complexos são componentes essenciais de todas as membranas celulares.
- Os fosfolipídios são as maiores estruturas lipídicas de todas as membranas, mas eles também têm propriedades funcionais importantes, como surfactantes, cofatores de enzimas de membrana e como componentes do sistema de transdução de sinal.
- A rota primária para a biossíntese *de novo* de fosfolipídios envolve a ativação de um dos componentes (ou DAG ou o grupamento cabeça) com CTP para formar um intermediário de alta energia, como CDP-diacilglicerol ou CDP-colina.
- Os fosfolipídios sofrem maturação na via de remodelação, na qual os grupos acila na posição *sn*-2 são substituídos por novos, conferindo diversidade e assimetria à porção hidrofóbica dos fosfolipídios.
- Os glicoesfingolipídios funcionam como receptores para reconhecimento célula-célula e interações, e como locais ligantes de bactérias simbiontes e patogênicas, e também de vírus. As estruturas de carboidratos nos glicoesfingolipídios de membranas das hemácias também são determinantes antigênicos responsáveis pelo tipo sanguíneo ABO e outros.
- Os glicoesfingolipídios são degradados nos lisossomos por uma sequência de reações que envolvem a remoção gradativa de açúcares da porção final não reduzida das moléculas, com uma hexoglicosidase lisossomal específica envolvida em cada passo. Diversas doenças hereditárias de armazenamento lisossomal resultam de defeitos na degradação de esfingolipídios.

Questões para aprendizagem

1. Descreva o significado da via de remodelação dos glicerofosfolipídios em vários

eventos biológicos.
2. Compare o papel dos plasmalogênios *versus* diacilglicerol fosfolipídios nas membranas celulares.
3. Discuta os desafios no desenvolvimento de uma vacina para proteger contra as tripanossomíases.
4. Revise o método terapêutico corrente para o diagnóstico e tratamento da síndrome da insuficiência respiratória aguda (SARA).
5. Revise os mecanismos de interação patógeno-hospedeiro, focando no papel das lecitinas na patogenicidade microbiana.

Leituras sugeridas

Beck, M. Therapy for lysosomal storage diseases. *IUBMB Life*. 2010; 62:33–40.

Brown, J. R., Crawford, B. E., Esko, J. D. Glycan antagonists and inhibitors: a fount for drug discovery. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2007; 42:481–515.

Cipolla, L., Araujo, A. C., Bini, D., et al. Discovery and design of carbohydrate-based therapeutics. *Expert Opin Drug Discov*. 2010; 5:721–737.

Desnick, R. J., Schuchman, E. H. Enzyme replacement therapy for lysosomal diseases: lessons from 20 years of experience and remaining challenges. *Annu Rev Hum Genet*. 2012; 13:307–335.

Kulkarni, A. A., Weiss, A. A., Iyer, S. S. Glycan-based high affinity ligands for toxins and pathogen receptors. *Med Res Review*. 2010; 30:327–393.

Mignani, R., Feriozzi, S., Schaefer, R. M., et al. Dialysis and transplantation in Fabry disease: indications for enzyme replacement therapy. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010; 5:379–385.

Sindou, H., Shimizu, T. Acyl-CoA:lysophospholipid acyltransferases. *J Biol Chem*. 2009; 284:1–5.

Van Meer, G., Voelker, D. R., Feigenson, G. W. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008; 9:112–124.

Yamamoto, F., Cid, E., Yamamoto, M., Blancher, A. ABO research in the modern era of genomics. *Transfus Med Rev*. 2012; 26:103–118.

Xu, Y. H., Barnes, S., Sun, Y., Grabowski, G. A. Multi-system disorders of glycosphingolipid and ganglioside metabolism. *J Lipid Res*. 2010; 51:1643–1675.

Sites

Blood groups: www.bloodbook.com/type-sys.html

Gaucher's disease: www.ninds.nih.gov/disorders/gauchers/gauchers.htm

Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: http://emedicine.medscape.com/article/207468-overview

Tay–Sachs disease: www.ninds.nih.gov/disorders/taysachs/taysachs.htm

CAPÍTULO 29

A Matriz Extracelular

Gur P. Kaushal, †Alan D. Elbein and Wayne E. Carver

Objetivos

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever a composição, estrutura e função da matriz extracelular (MEC) e de seus componentes, incluindo o colágeno, as proteínas não colágenas e os proteoglicanos.
- Delinear a sequência de etapas na biossíntese e na modificação pós-traducional do colágeno e da elastina, incluindo a estrutura e a síntese de ligações cruzadas.
- Discutir os papéis funcionais da MEC nos tecidos.
- Descrever as vias de biossíntese e a reciclagem dos proteoglicanos.
- Discutir a estrutura e função das integrinas enquanto receptores de componentes da MEC.
- Descrever patologias envolvendo componentes da MEC.

Introdução

A matriz extracelular (MEC) é uma complexa rede de macromoléculas secretadas localizadas no espaço extracelular. Historicamente, a MEC tem sido descrita simplesmente como a fornecedora de um suporte tridimensional para a organização dos tecidos e órgãos; entretanto, torna-se cada vez mais claro que a matriz extracelular possui um papel central na regulação dos processos celulares básicos, incluindo a proliferação, diferenciação, migração e até mesmo a sobrevivência celular. A rede macromolecular da MEC é formada por colágenos, elastina, glicoproteínas e proteoglicanos que são secretados por uma variedade de tipos celulares, incluindo os fibroblastos, os condrócitos, os osteoblastos e outros. Os componentes da MEC estão em contato íntimo com suas células de origem e formam um leito gelatinoso tridimensional, no qual as células se desenvolvem. As proteínas da MEC também estão ligadas à superfície das células, por isso tais proteínas transmitem sinais mecânicos resultantes do estiramento e

da compressão dos tecidos. A abundância relativa, distribuição e organização molecular dos componentes da MEC varia grandemente, dependendo do tipo de tecido, estágio de desenvolvimento e estado patológico. Variações na composição, acúmulo e organização da MEC têm um impacto dramático nas propriedades estruturais e funcionais do tecido. As mudanças nessas características da MEC estão associadas às doenças crônicas, como a artrite, aterosclerose, câncer e a fibrose.

Colágenos

Os colágenos são as principais proteínas na MEC

Os colágenos constituem uma família de proteínas que compreende cerca de 30% do total de massa proteica do corpo. Como componentes estruturais primários da MEC nos tecidos conjuntivos, os colágenos possuem um importante papel na arquitetura e integridade tecidual, bem como na mediação de uma variedade de interações célula-célula e célula-matriz. Até o presente, mais de 25 tipos diferentes de colágenos já foram identificados. Eles são compostos por cadeias peptídicas relacionadas, porém distintas, e variam consideravelmente em sua distribuição, organização e função nos tecidos.

Estrutura em tripla hélice dos colágenos

A estrutura em tripla hélice orientada para a esquerda do colágeno é única entre as proteínas

Os colágenos são proteínas heterotriméricas compostas por três cadeias peptídicas individuais. A principal característica estrutural do colágeno é a sua estrutura em tripla hélice, formada pelo enovelamento de três cadeias polipeptídicas. A análise por difração de radiografia indica que três cadeias em hélice orientadas para a esquerda são enroladas umas nas outras, como em uma corda, para formar a estrutura em super-hélice (Fig. 29.1). A hélice com orientação para a esquerda é mais extensa que a α-hélice das proteínas globulares, apresentando um aumento de aproximadamente duas vezes por giro e apenas três, em vez de 3,6, aminoácidos por giro da hélice. Todo o terceiro aminoácido é glicina, porque apenas este aminoácido com uma menor cadeia lateral encaixa-se no apertado eixo central. A sequência repetitiva característica do colágeno é **GLy-X-Y,** na qual X e Y podem ser qualquer aminoácido, porém mais frequentemente X é prolina e Y é hidroxiprolina. Por causa de sua rotação restrita e volume, a prolina e a hidroxiprolina conferem rigidez à hélice. As intra e intercadeias da hélice são estabilizadas por pontes de hidrogênio, predominantemente entre os grupos peptídicos NH e C = O. As cadeias laterais dos aminoácidos X e Y apontam para fora da hélice, e assim estão na superfície da proteína, onde formam interações laterais com outras triplas hélices ou proteínas.

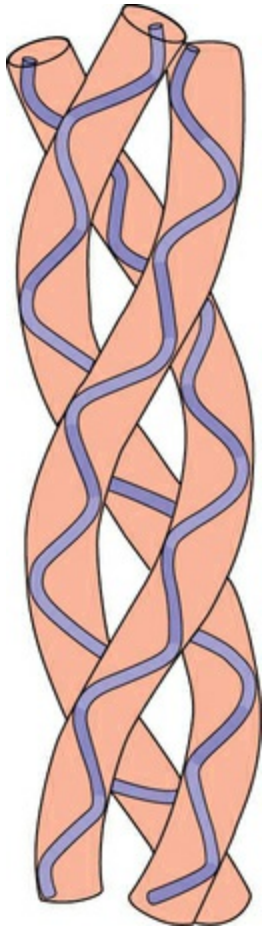


FIG. 29.1 Estrutura tridimensional do colágeno. As cadeias monoméricas do colágeno assumem uma estrutura terciária em α-hélice voltada para a esquerda. Elas, então, se associam para formar uma estrutura quaternária em super-hélice com três filamentos e orientada para a direita.

Tipos de colágeno

Alguns dos tipos de colágenos mais representativos estão listados na Tabela 29.1. A família de proteínas colagenosas pode ser dividida em dois tipos principais: os colágenos formadores de fibrila (fibrilares) e os colágenos não fibrilares.

Tabela 29.1

Membros da família do colágeno. Classificação e distribuição dos diferentes tipos de colágeno

Tipo	Classe	Distribuição
I	Fibrilar	Amplamente distribuído, incluindo pele, tendões, ossos e coração
II	Fibrilar	Cartilagem, córnea em desenvolvimento e humor vítreo
III	Fibrilar	Tecido conjuntivo extensível, p. ex., pele, pulmão e sistema vascular
IV	Rede	Membranas basais, rim e parede vascular
V	Fibrilar	Fígado, córnea e mucosa
VI	Filamentos com domínios globulares	Maioria dos tecidos conjuntivos
IX	Facit	Cartilagem, humor vítreo
XI	Formador de fibrila	Cartilagem, osso, placenta
XII	Facit	Tendão embrionário, pele
XIII	Com domínio transmembrana	Amplamente distribuído
XIV	Facit	Pele fetal e tendões

FACIT, colágenos associados à fibrila com triplas hélices interrompidas.

Colágenos formadores de fibrila

Os colágenos fibrilares conferem força tênsil aos tendões, ligamentos e pele

Os colágenos formadores de fibrilas incluem os tipos I, II, III, V e XI (Tabela 29.1). As fibrilas colágenas podem ser formadas de uma mistura de diferentes colágenos fibrilares. Por exemplo, as fibrilas colágenas dérmicas são híbridas dos colágenos dos tipos I e III, e as fibrilas do estroma corneano são híbridas dos colágenos dos tipos I e IV. O colágeno do tipo I é o mais abundante colágeno fibrilar e ocorre em uma grande variedade de tecidos; outros possuem uma distribuição tecidual mais limitada (Tabela 29.1). O colágeno do tipo I e colágenos fibrilares relacionados formam associações de fibrilas bandeadas bem organizadas e fornecem grande força de tensão à pele, tendões e ligamentos. Como mostrado, os colágenos são heterotriméricos, compostos por três cadeias peptídicas em α-hélice (Fig. 29.1). O colágeno heterotrimérico do tipo I é composto por duas cadeias α1(I) e uma cadeia α2(I). Cada uma dessas cadeias peptídicas contém cerca de 1.000 aminoácidos e apresenta um domínio estrutural em tripla hélice ao longo de quase todo o comprimento da molécula. As fibrilas de colágeno são formadas por associações laterais de triplas hélices em um alinhamento em "justaposição de um quarto", no qual cada molécula é deslocada cerca de um quarto do seu comprimento em relação à molécula vizinha mais próxima (Fig. 29.2). O **arranjo em justaposição de um quarto** é responsável pela aparência bandeada das fibrilas de colágeno nos tecidos conjuntivos. As fibrilas são estabilizadas tanto por ligações covalentes quanto por ligações cruzadas intercadeias derivadas de resíduos de lisina (ver a seguir).

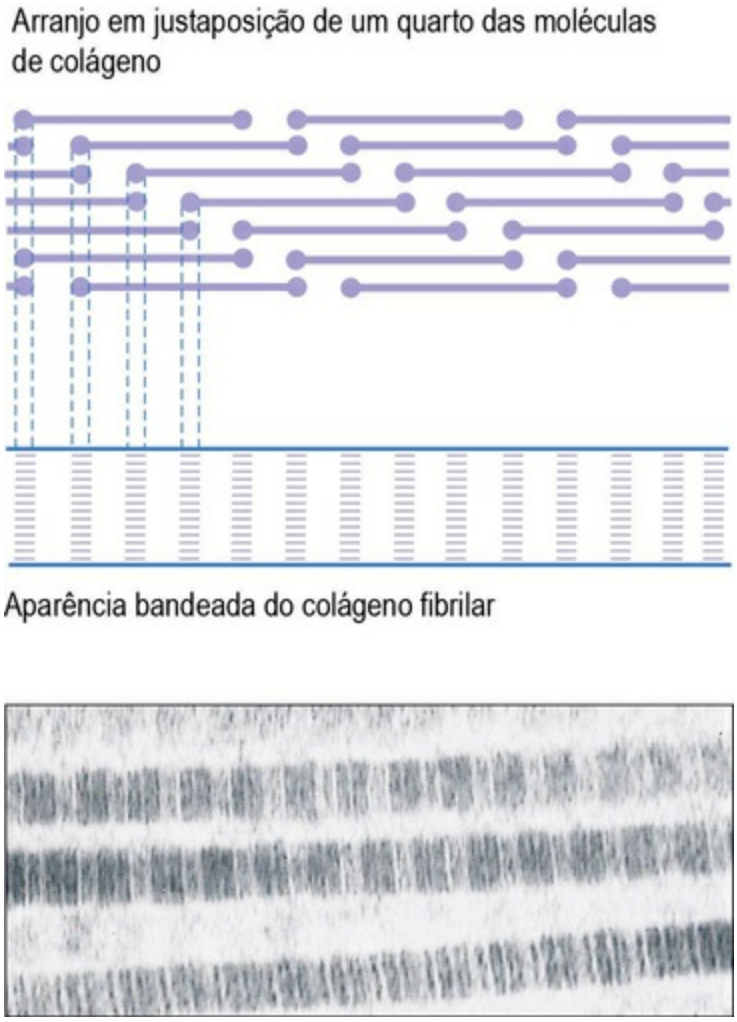


FIG. 29.2 Formação do arranjo em justaposição de um quarto das moléculas de colágeno em uma fibrila. A sobreposição regular das extremidades curtas, terminais não helicoidais, das cadeias do colágeno gera um padrão de bandeamento regular na fibra de colágeno. Micrografia eletrônica, cortesia do doutor Trevor Gray.

Colágenos não fibrilares

Os colágenos não fibrilares, formadores de rede, são componentes estruturais importantes das membranas basais

Os colágenos não fibrilares constituem um grupo heterogêneo que contém segmentos em tripla hélice de comprimentos variáveis interrompidos por um ou mais segmentos não helicoidais (não colagenosos). Este grupo inclui os colágenos da membrana basal (família do tipo IV), colágenos associados a fibrilas com triplas hélices interrompidas (FACITs) e colágenos com domínios em tripla hélice múltiplos com interrupções, conhecidos como multiplexinas. Colágenos não fibrilares se associam a colágenos fibrilares, formando microfibrilas e estruturas em rede ou similares a malhas.



Quadro clínico

Osteogênese imperfecta (incidência: 1 em 30.000-50.000)

Um menino com 6 anos foi atendido em um pronto-socorro com a tíbia e a fíbula quebradas durante um jogo de futebol. O pai dele, com 1,83 m, explicou que o filho havia quebrado as pernas quatro vezes enquanto estava na escola. Os dentes do pai eram levemente transparentes e descoloridos.

Comentário

A osteogênese imperfecta (OI), também chamada de doença do osso frágil, é uma doença congênita causada por múltiplos defeitos genéticos na síntese do colágeno do tipo I. Essa doença é caracterizada por ossos frágeis, pele delgada, dentes anormais e tendões fracos. A maioria dos indivíduos com essa doença possui mutações nos genes que codificam as cadeias de colágenos α1(I) e α2(I). Muitas dessas mutações são substituições de uma única base que convertem a glicina na sequência de repetição GLy-X-Y em aminoácidos maiores, impedindo o correto enovelamento das cadeias de colágeno em tripla hélice e sua montagem para a formação das fibrilas de colágeno. A predominância do colágeno do tipo I nos ossos explica porque estas estruturas são predominantemente afetadas. Entretanto, há uma notável variabilidade clínica, caracterizada pela fragilidade óssea, osteopenia, variáveis graus de baixa estatura e deformidades esqueléticas progressivas. A forma mais comum de OI, com uma apresentação que algumas vezes é confundida com abuso infantil, possui um bom prognóstico, com a ocorrência das fraturas diminuindo após a puberdade, ainda que a redução geral da massa óssea signifique que os riscos continuem altos por toda a vida. Os pacientes frequentemente desenvolvem deficiência auditiva devido à osteosclerose, em parte por recorrentes fraturas dos estribos. Os fármacos chamados de bifosfonatos (Cap. 26) inibem a atividade dos osteoclastos e com isso restringem a regeneração óssea normal, diminuindo a incidência das fraturas. Os estudos de acompanhamento em longo prazo encontram-se em andamento.

As membranas basais são camadas relativamente finas da MEC, encontradas na porção basal das células epiteliais; estas membranas circundam outros tipos celulares incluindo os miócitos, células de Schwann e adipócitos. A membrana basal apresenta inúmeras funções, que incluem a ancoragem das células no tecido conjuntivo adjacente e a filtração.

O colágeno do tipo IV constitui uma flexível trama. Este colágeno contém um domínio longo em tripla hélice interrompido por sequências não colagenosas curtas. Estas interrupções no domínio helicoidal bloqueiam a contínua associação de duas triplas hélices e as obrigam a encontrar outras parceiras, contribuindo assim para a formação de uma estrutura em treliça. No rim, a espessa membrana basal (100-200 nm de espessura) na porção basal das células endoteliais dos capilares glomerulares desempenha um papel essencial como um filtro macromolecular (Cap. 23). A rede de proteínas da MEC na membrana basal restringe a passagem de grandes moléculas do sangue para a urina. Além disso, a inclusão de proteoglicanos carregados negativamente (descritos a seguir neste capítulo) na membrana basal glomerular restringe a passagem de moléculas carregadas. Anormalidades no colágeno do tipo IV na membrana basal glomerular

resultam em diversas doenças glomerulares, incluindo a **síndrome de Goodpasture** e a **síndrome de Alport.** A síndrome de Goodpasture é uma rara doença autoimune causada pela produção de anticorpos que especificamente se ligam ao colágeno do tipo IV das membranas basais. Esta condição inflamatória leva a uma progressiva deterioração da função da membrana basal nos rins e algumas vezes no pulmão. A síndrome de Alport é resultante de mutações nas cadeias do colágeno do tipo IV que causam um defeito na montagem do molde de colágeno das membranas basais. Os sintomas de ambas as síndromes progridem do aparecimento de sangue na urina (hematúria) para a urina contendo proteína em excesso (proteinúria) e, por fim, para a falência renal.

Síntese e modificação pós-traducional dos colágenos

A síntese de colágeno começa no retículo endoplasmático rugoso (RER)

Após a síntese no RER, o nascente polipeptídio colágeno sofre extensa modificação. Primeiro no RER, posteriormente no aparelho de Golgi, e finalmente no espaço extracelular, onde é modificado em uma fibrila colágena extracelular madura (Fig. 29.3). Uma cadeia polipeptídica nascente, pré-pró- colágeno, é sintetizada inicialmente com uma sequência sinal hidrofóbica que facilita sua ligação nos ribossomos do retículo endoplasmático (RE) e direciona a cadeia polipeptídica em crescimento até a luz do RE. A modificação pós-traducional da proteína começa com a remoção do peptídio sinal no RE, originando o pró-colágeno. Então, três diferentes hidroxilases adicionam grupos hidroxilas aos resíduos de prolina e de lisina, formando 3- e 4-**hidroxiprolinas** e δ-**hidroxilisina.** Essas hidroxilases requerem ácido ascórbico (vitamina C) como um cofator (Fig. 29.3, etapa 1). A deficiência de vitamina C leva ao **escorbuto,** como resultado das alterações na síntese e em suas ligações cruzadas do colágeno (Cap. 11).

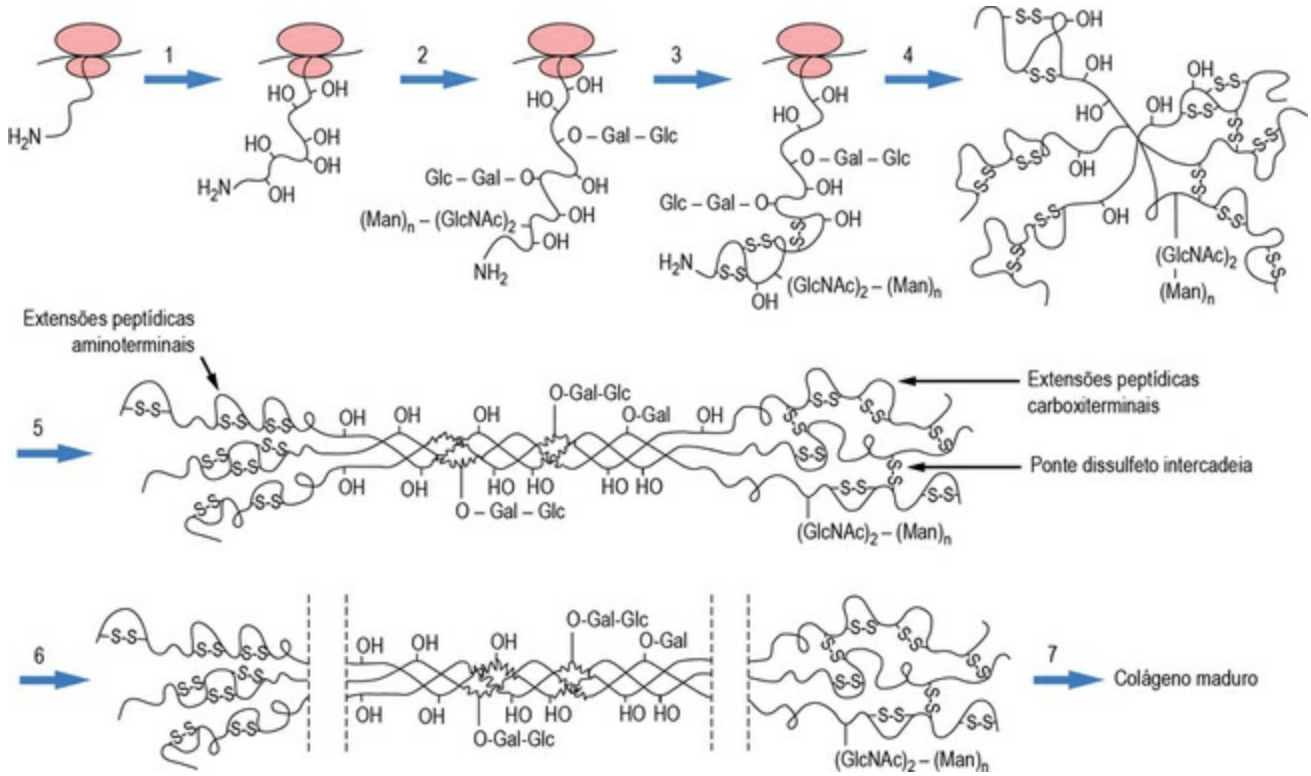


FIG. 29.3 Biossíntese e processamento pós-traducional do colágeno no retículo endoplasmático. O colágeno é sintetizado no RER e pós- -traducionalmente modificado no aparelho de Golgi; depois é secretado, clivado nos seus peptídios de extensão, e finalmente é montado em fibrilas no espaço extracelular. (1) Hidroxilação dos resíduos prolina e lisina. (2) Adição dos oligossacarídios *O*-ligados e *N*-ligados. (3) Formação de pontes dissulfeto intracadeias no *N*-terminal da cadeia polipeptídica nascente. (4) Formação dos dissulfetos intercadeias nos domínios *C*-terminais, que auxiliam no alinhamento das cadeias. (5) Formação do tropocolágeno solúvel com cadeia tripla e o transporte para as vesículas do Golgi. (6) Exocitose e remoção dos pró-peptídios *N*- e *C*-terminais. (7) Estágios finais do processamento, incluindo associação lateral das triplas hélices, ligações cruzadas covalentes e a formação da fibra colágena. Gal, galactose; Glc, glicose; GlcNAc, *N*-acetilglicosamina; Man, manose.

A glicosilação *O*-ligada ocorre pela adição de resíduos de galactosil na hidroxilisina pela galactosil transferase; então, um dissacarídio é formado pela adição de glicose na galactosil hidroxilisina pela glicosiltransferase (Fig. 29.3, etapa 2). Essas enzimas possuem especificidade restrita aos substratos hidroxilisina ou para a galactosil hidroxilisina, e estas glicosilam apenas aquelas sequências peptídicas que estão em domínios não colagenosos. A glicosilação *N*-ligada também ocorre em resíduos específicos de asparagina em domínios não fibrilares. Os colágenos não fibrilares, com uma grande extensão de domínios não helicoidais, são mais glicosilados do que os colágenos fibrilares. Assim a extensão da glicosilação pode influenciar a estrutura da fibrila, interrompendo a formação da fibrila e promovendo as interações intercadeias necessárias para a estrutura em rede. Pontes de dissulfeto intra e intercadeias são formadas nos domínios *C*-terminais por uma proteína dissulfeto isomerase, facilitando a associação e o enovelamento das cadeias peptídicas em tripla hélice (Fig. 29.3, etapas 3-5). Nesse estágio, o **pró-colágeno** ainda é solúvel e contém extensões não helicoidais adicionais em suas extremidades *N*- e *C*-terminais.

O pró-colágeno é finalmente modificado em colágeno no aparelho de Golgi

Após a montagem em tripla hélice, o pró-colágeno é transportado do RER para o

aparelho de Golgi, onde é empacotado em agregados cilíndricos dentro de vesículas secretoras, e então exportado para o espaço extracelular por exocitose. Neste momento, as extensões não helicoidais do pró-colágeno são removidas no espaço extracelular por proteinases *N*- e *C*-terminais específicas para o pró- -colágeno (Fig. 29.3, etapa 6). As moléculas de **"tropocolágeno"** montam-se então em fibrilas de colágeno insolúveis, que mais adiante vão ser estabilizadas pela formação de ligações cruzadas intermoleculares derivadas de aldeído. A **lisil oxidase** (não confundir com a lisil hidroxilase envolvida na formação da hidroxilisina) desamina oxidativamente o grupo amina das cadeias laterais de alguns resíduos de lisina e hidroxilisina, produzindo derivados reativos de aldeído, conhecidos como **alisina e hidroxialisina.** Esses grupos aldeídicos formam neste momento produtos de condensação aldol com outros grupos aldeídicos vizinhos, gerando ligações cruzadas tanto dentro quanto entre as moléculas de tripla hélice. Eles também podem reagir com os grupos amina de resíduos não oxidados de lisina e de hidroxilisina para formar as ligações cruzadas da base de Schiff (imina) (Fig. 29.4). Os produtos iniciais podem se reorganizar; ou podem ser desidratados, ou reduzidos para formar ligações cruzadas estáveis, como a **lisinonorleucina.** Estudos com β-aminopropionitrilo, que inibe a enzima lisil oxidase, têm demonstrado que a formação das ligações cruzadas do colágeno é o principal determinante para as propriedades mecânicas dos tecidos e para sua força.

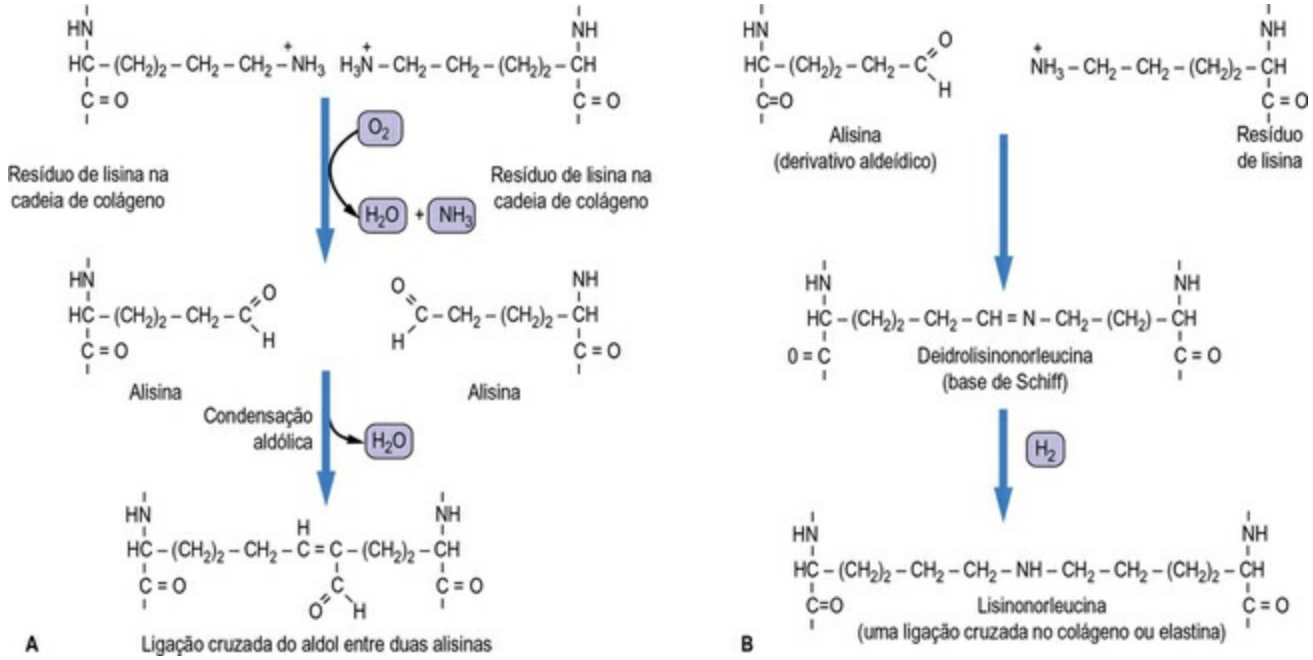


FIG. 29.4 Formação da ligação cruzada do colágeno. A alisina (e a hidroxialisina) são precursores da formação da ligação cruzada do colágeno pela **(A)** condensação aldólica e **(B)** com a base de Schiff (imina) como intermediária.

Quadro clínico

Latirismo: o resultado da inibição da lisil oxidase

O latirismo é uma doença induzida pela dieta, caracterizada pela deformação da coluna, deslocamento das articulações, desmineralização dos ossos, aneurismas aórticos e hemorragias articulares. Estes problemas se desenvolvem como resultado da inibição da lisil oxidase, uma enzima necessária para as ligações cruzadas das cadeias de colágeno. O latirismo pode ser causado pela ingestão crônica de ervilha-de-cheiro, *Lathyrus odoratus*, cujas sementes contêm β-aminopropionitrilo, um inibidor irreversível da lisil oxidase. A penicilamina, um composto tiol usado para a terapia de quelação em casos de toxicidade por metais pesados, também causa latirismo por causa da quelação adicional do cobre, que é necessário para a atividade da lisil oxidase, ou da reação com os grupos aldeídos da (hidroxi)alisina, inibindo as reações de ligação cruzada do colágeno.

Proteínas não colagenosas na matriz extracelular

Elastina

Interações hidrofóbicas fracas entre resíduos de valina permitem a flexibilidade e a extensibilidade da elastina

A flexibilidade requerida para a função dos vasos sanguíneos, pulmões, ligamentos e pele é fornecida por uma rede de fibras elásticas na MEC desses tecidos. A proteína predominante das fibras elásticas é a elastina. Diferentemente da família multigênica do colágeno, existe apenas um gene para a elastina, que codifica um polipeptídio com cerca de 750 aminoácidos de comprimento. Em comum com os colágenos, ela é rica em resíduos de glicina e de prolina, porém mais hidrofóbica: um em cada sete de seus aminoácidos é uma valina. Diferentemente dos colágenos, a elastina contém pouca hidroxiprolina e nenhuma hidroxilisina ou cadeias de carboidrato, além de não apresentar uma estrutura secundária regular. Sua estrutura primária consiste em domínios hidrofílicos e hidrofóbicos alternados, ricos em lisina evalina. As lisinas estão envolvidas nas ligações cruzadas intermoleculares, enquanto as fracas interações entre os resíduos de valina nos domínios hidrofóbicos conferem elasticidade à molécula.



Quadro clínico

Síndrome de marfan: resultado de mutações no gene para fibrilina

A ultraestrutura das fibras elásticas revela a elastina como um eixo amorfo, polimérico e insolúvel coberto por uma bainha de microfibrilas que contribuem para a estabilidade da fibra elástica. A glicoproteína fibrilina é o constituinte predominante das microfibrilas. A síndrome de Marfan é uma doença genética relativamente rara dos tecidos conjuntivos, causada por mutações no gene para fibrilina (frequência: 1 em 10.000 nascimentos). Pessoas com esta doença apresentam estatura tipicamente alta, pernas e braços longos e aracnodactilia (dedos longos com forma semelhante às patas

de aranha). Esta doença (em sua forma mais branda) causa articulações frouxas, coluna vertebral deformada, prolapso da valva mitral (levando à regurgitação cardíaca) e problemas oculares, como o deslocamento do cristalino. Em indivíduos gravemente afetados, a parede da aorta é propícia a rupturas por causa dos defeitos na formação das fibras elásticas.

A forma monomérica solúvel da elastina inicialmente sintetizada no RER é chamada de tropoelastina. Com exceção de alguma hidroxilação da prolina, a tropoelastina não sofre modificação pós-traducional. Durante o processo de montagem no espaço extracelular, a lisil oxidase gera alisina em sequências específicas: -Lis-Ala-Ala-Lis- e -Lis-Ala-Ala-Ala-Lis-. Como o colágeno, o aldeído reativo da alisina se condensa com outras alisinas ou com lisinas não modificadas. A alisina e a de-hidrolisinonorleucina em diferentes cadeias de tropoelastina também se condensam para formar ligações cruzadas de piridínio — estruturas heterocíclicas conhecidas como **desmosinas** e **isodesmosinas** (Fig. 29.5). Por causa da forma como os monômeros de elastina são interligados em polímeros, a elastina pode se esticar em duas dimensões.

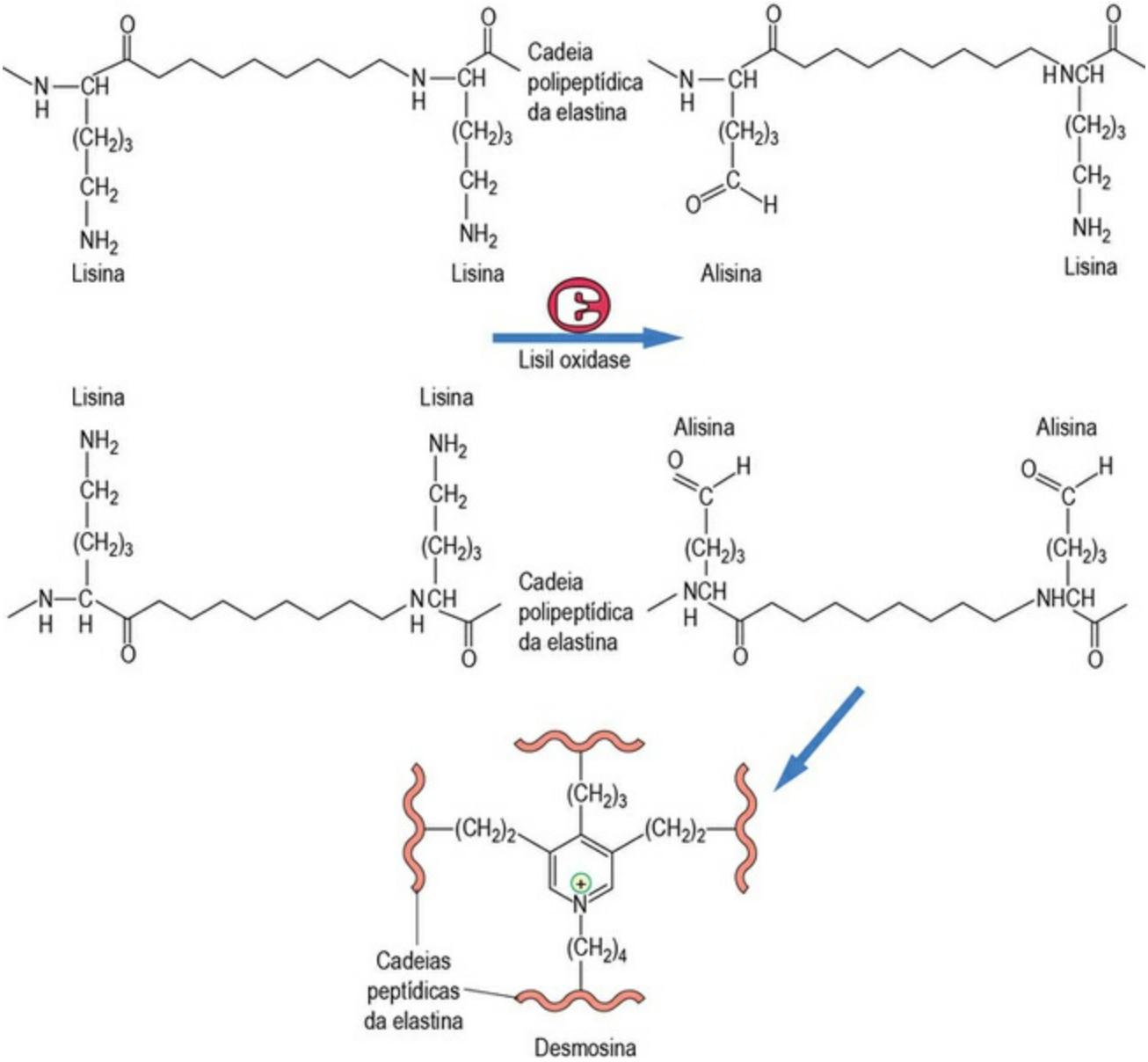


FIG. 29.5 Desmosina — uma ligação cruzada multicadeia na elastina. Resíduos de alisina e deidrolisinonorleucina em cadeias de elastina adjacentes reagem para formar o polímero elástico tridimensional com ligações cruzadas feitas pela desmosina.

Fibronectina

A fibronectina e a laminina têm múltiplos sítios de ligação para proteínas e proteoglicanos da MEC

A fibronectina é uma glicoproteína que se apresenta como um componente estrutural da MEC e também está presente no plasma como uma proteína solúvel. A fibronectina é um dímero de duas subunidades idênticas, cada uma com cerca de 230 kDa, ligadas por pontes de dissulfeto em seus terminais carboxila. Cada subunidade é organizada em domínios, conhecidos como domínios do tipo I, II e III, e cada um desses domínios possui várias unidades homólogas repetidas, ou módulos, em sua estrutura primária: existem 12 módulos do tipo I, dois módulos do tipo II, e 15-17 módulos do tipo III. Cada módulo é dobrado independentemente, formando uma estrutura semelhante a um "colar de contas". Pelo menos 20 isoformas diferentes de fibronectina específicas de tecido

foram identificadas, todas produzidas por *splicing* alternativo de um único ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) precursor. O *splicing* alternativo é regulado não só de forma tecidual específica, mas também durante a embriogênese, a cicatrização e a oncogênese. A fibronectina plasmática secretada, principalmente por células hepáticas, é desprovida de dois módulos do tipo III, que são encontrados nas formas de fibronectina associadas à célula e à matriz. Por causa da sua estrutura com multidomínios e da sua habilidade em interagir com as células e com outros componentes da MEC, alterações na expressão da fibronectina afetam a adesão e a migração celular, a morfogênese embrionária, a organização do citoesqueleto e da MEC.

Os domínios funcionais na fibronectina têm sido identificados por meio de sua afinidade de ligação com outros componentes da MEC, incluindo o colágeno, a heparina, a fibrina e a superfície celular. Os módulos do tipo I interagem com a fibrina, a heparina e o colágeno; os módulos do tipo II possuem domínios ligantes de colágeno; e os módulos do tipo III estão envolvidos na ligação com a heparina e com a superfície celular. As interações específicas foram adicionalmente mapeadas para curtos trechos de aminoácidos. Uma pequena sequência peptídica contendo **Arg-Gly-Asp (RGD),** presente na 10ª repetição do módulo do tipo III da fibronectina, liga-se a proteínas da família das integrinas presentes nas superfícies celulares; esta sequência não é única para a fibronectina, mas é também encontrada em outras proteínas na MEC. Outra sequência, Pro-X-Ser-Arg- -Asn (PXSRN), presente na nona repetição do módulo do tipo III, é implicada na adesão celular mediada por integrina. A perda da fibronectina na superfície de várias células tumorais pode contribuir para sua liberação na circulação e penetração através da MEC, uma das primeiras etapas na metástase tumoral.

Lamininas

As lamininas constituem uma família de glicoproteínas não colagenosas encontradas nas membranas basais e expressas de formas diversas em diferentes tecidos. Estas são grandes moléculas heterotriméricas (850 kDa), compostas por cadeias α, β e γ. Até o presente, cinco cadeias α, quatro cadeias β e três cadeias γ foram identificadas, as quais podem se associar para produzir pelo menos 15 variantes de laminina diferentes. As três cadeias estão arranjadas em uma molécula assimétrica em forma de cruz, mantidas juntas por ligações dissulfeto. As lamininas sofrem polimerização espontânea reversível na presença de cálcio, contribuindo para a elaboração da complexa rede na membrana basal. Estudos bioquímicos e de microscopia eletrônica indicam que todos os braços curtos distendidos da laminina são necessários para a polimerização espontânea, e que o polímero é formado pela junção das extremidades dos braços curtos em uma rede polimérica. Semelhante à fibronectina, as lamininas interagem com as células por múltiplos sítios de ligação em diversos domínios da molécula. As cadeias α possuem locais de ligação para integrinas e sulfato de heparano (ver a seguir). Os polímeros de laminina também são conectados ao colágeno do tipo IV por uma proteína de cadeia única, **nidogênio** ou **entactina,** que possui um local de ligação para o colágeno e, em comum com a fibronectina, também apresentam uma sequência RGD para ligação da

integrina. O nidogênio também se liga a proteínas centrais dos proteoglicanos (ver a seguir). Ele desempenha um papel central na formação de ligações cruzadas entre a laminina e o colágeno do tipo IV, gerando uma plataforma para a ancoragem das células e das moléculas da MEC nas membranas basais.

Proteoglicanos

Os proteoglicanos são componentes da MEC formadores de gel e constituem o que classicamente tem sido chamado de "substância fundamental". Alguns proteoglicanos localizam-se na superfície celular, onde se ligam a fatores de crescimento e outros componentes da MEC. Eles são compostos de cadeias peptídicas contendo açúcares ligados covalentemente. Entretanto, as cadeias peptídicas dos proteoglicanos geralmente são mais rígidas e mais longas do que as porções proteicas das glicoproteínas; os proteoglicanos contêm quantidades muito maiores de carboidrato — tipicamente carboidrato >95%. As cadeias de açúcar são oligossacarídios lineares, não ramificados, que são muito mais longos do que aqueles das glicoproteínas, e podem conter mais de cem resíduos de açúcar em uma única cadeia. Além disso, as cadeias de oligossacarídios dos proteoglicanos possuem uma unidade dissacarídio repetida, geralmente composta por um ácido urônico e um açúcar aminado. As cadeias de oligossacarídios dos proteoglicanos são polianiônicas por causa das muitas cargas negativas dos grupos carboxila dos ácidos urônicos, bem como dos grupos sulfatos ligados a alguns dos grupos hidroxila ou amina dos açúcares.



Quadro clínico

Distrofia muscular

Distrofias musculares formam um grupo heterogêneo de desordens genéticas que resultam em um progressivo declínio na força e na estrutura muscular. Até o exato momento, as mutações que resultam na distrofia muscular já foram identificadas em mais de 30 genes. Vários dos produtos gênicos identificados são componentes do complexo MEC-superfície celular-citoesqueleto das células musculares. Em especial, uma classe da distrofia muscular é causada por mutações na cadeia $\alpha 2$ da laminina-2. Estas mutações impedem a formação normal do polímero da laminina-2 e resultam na organização anormal da membrana basal circundante das fibras musculares esqueléticas de pacientes com este tipo de distrofia muscular.

Estruturas dos proteoglicanos

Os glicosaminoglicanos são os componentes polissacarídios dos proteoglicanos

As estruturas gerais dos glicosaminoglicanos (GAGs) são mostradas na Tabela 29.2. A **repetição dissacarídica** é diferente para cada tipo de GAG, mas é geralmente composta

por uma hexosamina e um resíduo de ácido urônico, exceto no caso do sulfato de queratano, no qual o ácido urônico é substituído por galactose. O açúcar aminado nas GAGs costuma ser a glicosamina ($GlcNH_2$) ou a galactosamina ($GalNH_2$); ambas estão presentes principalmente em suas formas *N*-acetiladas (GlcNAc e GalNAc), embora em algumas das GAGs (heparina e sulfato de heparano) o grupo amina é sulfatado, em vez de acetilado. O ácido urônico é geralmente o ácido d-glicurônico (GlcUA), mas em alguns casos (sulfato de dermatano, heparina) ele pode ser o **ácido l-idurônico (IdUA).** Com exceção do ácido hialurônico e do sulfato de queratano, todas as GAGs são ancoradas às proteínas por uma ponte trissacarídica, Gal-Gal-Xyl, sendo a xilose ligada ao resíduo de serina ou de treonina de uma proteína central. O sulfato de queratano também é ligado à proteína, mas neste caso a ligação é feita por um oligossacarídio *N*-ligado (sulfato de queratano I), ou de um oligossacarídio *O*-ligado (sulfato de queratano II). O ácido hialurônico, que possui as maiores cadeias polissacarídeas, é a única GAG que não parece estar ligada a uma proteína central.

Tabela 29.2

Estrutura e distribuição dos proteoglicanos

Proteoglicano	Dissacarídio característico	Sulfatação	Localização tecidual
Ácido hialurônico	[4GlcUAβ1- 3GlcNAcβ1]	Nenhuma	Fluidos articulares e oculares
Sulfatos de condroitina	[4GlcUAβ1- 3GalNAcβ1]	GalNAc	Cartilagem, tendões e osso
Sulfato de dermatano	[4IdUAα1- 3GalNAcβ1]	IdUA, GalNAc	Pele, válvulas, vasos sanguíneos
Sulfato de heparano	[4IdUAα1- 4GlclNAcβ1]	GlcNAc	Superfícies celulares
Heparina	[4IdUAα1- 4GlclNAcβ1]	$GlcNH_2$, IdUA	Mastócitos, fígado
Sulfatos de queratano	[3Galβ1- 4GlclNAcβ1]	GlcNAc	Cartilagem, córnea

GalNAc, N-acetilgalactosamina; $GlcNH_2$, glicosamina; GlcUA, ácido d-glicurônico; IdUA, ácido l-idurônico.



Quadro clínico

Epidermólise bolhosa

Epidermólise bolhosa é uma rara disfunção hereditária caracterizada pela grave formação de bolhas na pele e no tecido epitelial. Três tipos são conhecidos:

- **Simples:** Formação de bolhas na epiderme, causada por defeitos nos filamentos de queratina
- **Juncional:** Formação de bolhas na junção dermoepidérmica, causada por defeitos na laminina
- **Distrófica:** Formação de bolhas na derme, causada por mutações no gene que codifica o colágeno do tipo VII.

A epidermólise bolhosa ilustra a natureza multifatorial das doenças do tecido

conjuntivo que possuem características clínicas similares.

Ácido hialurônico

O ácido hialurônico, o único glicosaminoglicano não sulfatado, tem um papel único na montagem de proteoglicanos

O ácido hialurônico é composto por unidades repetidas de GlcUA e de GlcNAc. Esta cadeia polissacarídica é a mais longa das GAGs, com peso molecular de 10^5-10^7 Da (250-25.000 unidades dissacarídicas repetidas), sendo a única GAG não sulfatada.

Sulfatos de condroitina

Os sulfatos de condroitina são os principais componentes da cartilagem. Eles contêm particularmente GalNAc em vez de GlcNAc como açúcar aminado, e suas cadeias polissacarídeas são menores: 2-5 × 10^5 Da. As cadeias de condroitina são ligadas à proteína pela região do trissacarídio de ligação (Gal-Gal-Xyl) e contêm resíduos de sulfato ligados no grupo 4- ou 6-hidroxila da GalNAc.

Sulfato de dermatano

O sulfato de dermatano foi originalmente isolado da pele, mas também é encontrado nos vasos sanguíneos, nos tendões e nas válvulas cardíacas. Essa GAG tem estrutura similar ao sulfato de condroitina, porém possui uma variável quantidade de ácido L-idurônico (IdUA), o epímero *C*-5 da D-GlcUA, formado em uma reação não usual, pela epimerização do GlcUA, após ter sido incorporado no polímero. O sulfato de dermatano possui uma densidade de carga mais alta do que os sulfatos de condroitina, pois contém resíduos sulfato na posição *C*-2 em alguns resíduos de IdUA, e nos grupos 4-hidroxila da GalNAc.

Heparina e sulfato de heparano

A heparina é um GAG pequeno, altamente carregado, com forte atividade anticoagulante

A heparina e o sulfato de heparano consistem, sobretudo, em repetidas unidades dissacarídicas de $GlcNH_2$ com IdUA ou GlcUA, respectivamente. A ligação entre o açúcar aminado e o ácido urônico é uniformemente 1-4, em vez das ligações alternadas 1-4/1-3, observadas em outras GAGs. A maioria das unidades $GlcNH_2$ da heparina é *N*-sulfatada, enquanto muitos dos resíduos de IdUA são sulfatados no grupo hidroxila do *C-2*, e os resíduos de $GlcNH_2$ são no grupo hidroxila do *C-6*. A heparina e o sulfato de heparano são as GAGs mais altamente carregadas. Ainda que as estruturas desses dois polímeros sejam intimamente relacionadas, suas distribuições no corpo e suas funções são totalmente diferentes: a heparina é uma pequena molécula micro-heterogênea (quase 3.000-30.000 Da), encontrada intracelularmente como um proteoglicano. Ela é liberada para o espaço extracelular como um polissacarídio livre (GAG) e possui forte atividade

anticoagulante (Cap. 7). Em contrapartida, o sulfato de heparano é ligado à MEC ou à superfície das células, e possui apenas fraca atividade anticoagulante.

Sulfato de queratano

A estrutura final das GAGs, mostrada na Tabela 29.2, é o sulfato de queratano (QS). Esta é uma GAG particularmente incomum porque ela é ligada à proteína por meio de um oligossacarídio *N*-ligado (QS I) ou de um oligossacarídio *O*-ligado (QS II). Assim esta GAG possui características comuns a ambos, proteoglicanos e glicoproteínas. Contudo, o sulfato de queratano é considerado um proteoglicano por causa da porção glicana que possui uma unidade dissacarídica repetida e uma longa cadeia linear. A unidade repetida é composta por GlcNAc e galactose em lugar do ácido urônico. Ambas, a GlcNAc e a galactose, são geralmente sulfatadas nos grupos hidroxila *C-6*.

Síntese e degradação dos proteoglicanos

A estrutura dos glicosaminoglicanos é determinada pelo complemento da célula em glicosil e sulfotransferases

Os proteoglicanos são sintetizados por uma série de glicosiltransferases, epimerases e sulfotransferases, iniciando com a síntese do **centro do trissacarídio (Xyl→Gal→Gal)** enquanto a proteína ainda está no RER. A síntese do oligossacarídio repetido e outras modificações ocorrem no aparelho de Golgi. Tal como acontece na síntese das glicoproteínas e glicolipídios, enzimas distintas estão envolvidas em etapas individuais. Por exemplo, existem galactosil transferases separadas para cada unidade de galactose da ponte de ligação, uma GlcUA transferase distinta para a ponte de ligação e dissacarídios em repetidos e diferentes sulfotransferases para as posições *C*-4 e *C*-6 dos resíduos GalNAc dos sulfatos de condroitina. O fosfossulfato de fosfoadenosina (PAPS) é o doador de sulfato para as sulfotransferases. Essas vias estão ilustradas na Figura 29.6, para o 6-sulfato de condroitina.

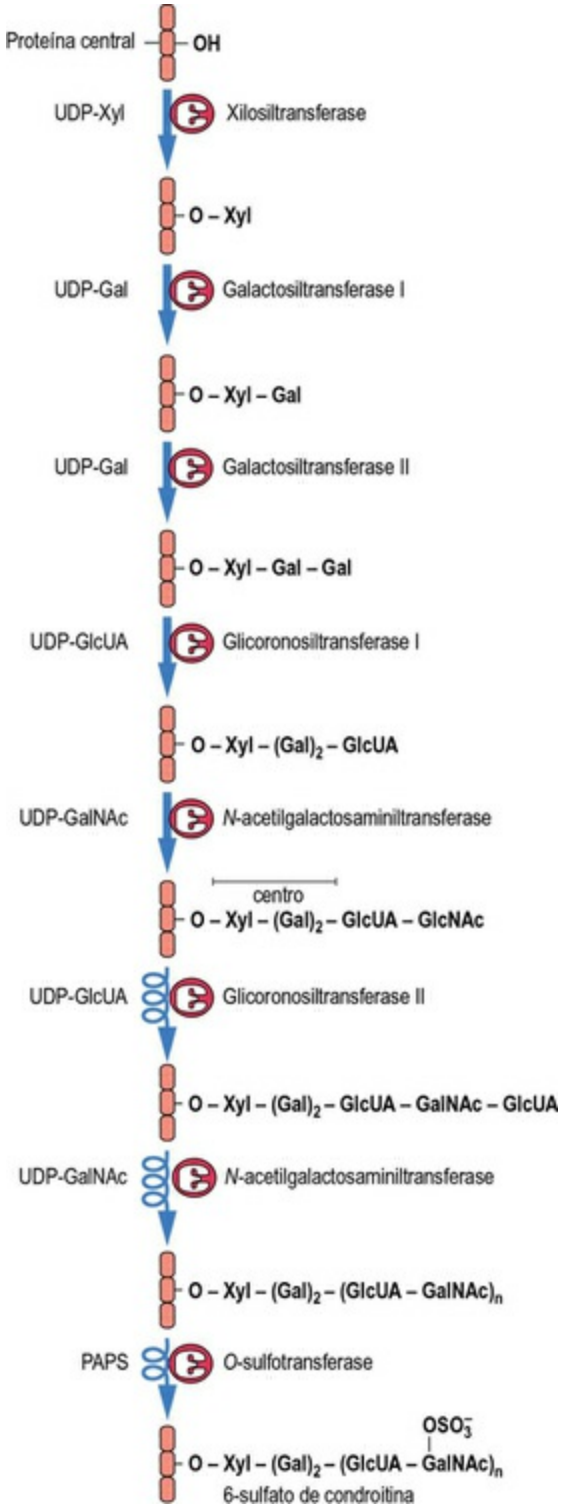


FIG. 29.6 Síntese do proteoglicano 6-sulfato de condroitina. Diversas enzimas participam desta via. Xyl, xilose.

Defeitos na degradação de proteoglicanos levam a mucopolissacaridoses

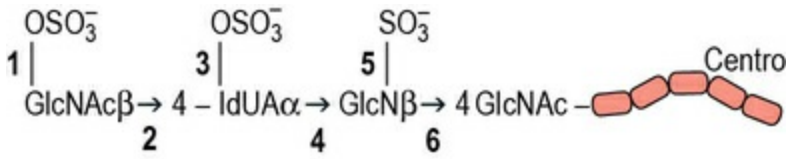
A degradação dos proteoglicanos ocorre nos lisossomos. A porção proteica é degradada por proteases lisossomais e as cadeias de GAG são degradadas por ações sequenciais de várias hidrolases ácidas lisossomais diferentes. A degradação gradativa das GAGs envolve exoglicosidases e sulfatases, iniciando da extremidade livre da cadeia de glicana. Essa reação pode envolver a remoção de sulfato por uma sulfatase, posteriormente a remoção do açúcar terminal por uma glicosidase específica, e assim por diante. A Figura 29.7 mostra as etapas da degradação do sulfato de dermatano. Assim como na

degradação dos glicoesfingolipídios, se uma das enzimas envolvidas nas etapas gradativas da via estiver faltando, todo o processo de degradação é interrompido neste ponto e as moléculas não degradadas se acumulam nos lisossomos. As doenças de depósito lisossomal resultantes da acumulação das GAGs são conhecidas como **mucopolissacaridoses** (Tabela 29.3) por causa da designação original das GAGs como mucopolissacarídios. Existem mais de uma dúzia de mucopolissacaridoses resultantes de defeito na degradação das GAGs. Em geral, estas doenças podem ser diagnosticadas pela identificação de cadeias específicas de GAGs na urina, seguida pela análise de hidrolases específicas em leucócitos ou fibroblastos.

Tabela 29.3

Defeitos enzimáticos característicos de várias mucopolissacaridoses

Síndrome	Enzima deficiente	Produto acumulado nos lisossomos e secretado na urina
De Hunter	Iduronato sulfatase	Sulfatos de heparano e dermatano
De Hurler	α-iduronidase	Sulfatos de heparano e dermatano
De Morquio A	Galactose-6-sulfatase	Sulfato de queratano
De Morquio B	β-galactosidade	Sulfato de queratano
De Sanfilippo A	Heparano sulfamidase	Sulfato de heparano
De Sanfilippo B	*N*-acetilglicosaminidase	
De Sanfilippo C	*N*-acetilglicosamina-6- sulfatase	



1. GlcNAc-6-sulfatase
2. Hexosaminidase
3. Iduronato sulfatase
4. Iduronidase
5. *N*-sulfatase
6. Glicosaminidase

FIG. 29.7 Degradação do sulfato de dermatano. Esta reação ocorre por meio de uma sequência definida de atividades de hidrolases lisossômicas.

Funções dos proteoglicanos

Escovas de garrafa, gel moldável e concreto reforçado

Os proteoglicanos são encontrados em associação com a maioria dos tecidos e células. Um de seus principais papéis é fornecer suporte estrutural para os tecidos,

especialmente para a cartilagem e o tecido conjuntivo. Na cartilagem, grandes agregados, compostos por cadeias de sulfato de condroitina e de sulfato de queratano ligadas às suas proteínas centrais, são associados não covalentemente ao ácido hialurônico por meio de **proteínas de ligação**, formando uma matriz semelhante à gelatina, na qual fibras colágenas estão embebidas. Essa macromolécula, em **estrutura similar de "escova de garrafa",** conhecida como agrecano (Fig. 29.8), fornece tanto rigidez como estabilidade para o tecido conjuntivo. Em virtude de sua carga negativa, as GAGs ligam grandes quantidades de cátions monovalentes e divalentes: uma molécula de proteoglicano da cartilagem de 2×10^6 Da pode ter um agregado de cargas negativas de cerca de 10.000. Consequentemente, a manutenção da neutralidade elétrica requer uma alta concentração de íons de carga oposta. Esses íons atraem a água para dentro da MEC, causando sua turgidez e enrijecimento, o resultado da tensão entre forças osmóticas e interações de ligação entre os proteoglicanos e o colágeno. A estrutura e a hidratação da MEC permitem algum grau de rigidez combinada com flexibilidade e compressibilidade, capacitando o tecido a suportar torções e choques. Os agregados de ácido hialurônico-proteoglicano-colágeno nos discos vertebrais e articulares possuem algumas das propriedades viscoelásticas de "gel moldável", compressibilidade mais elasticidade, amortecendo assim o impacto entre os ossos. Estes discos são comprimidos durante o dia, expandem-se elasticamente durante a noite e deformam-se gradualmente com a idade.

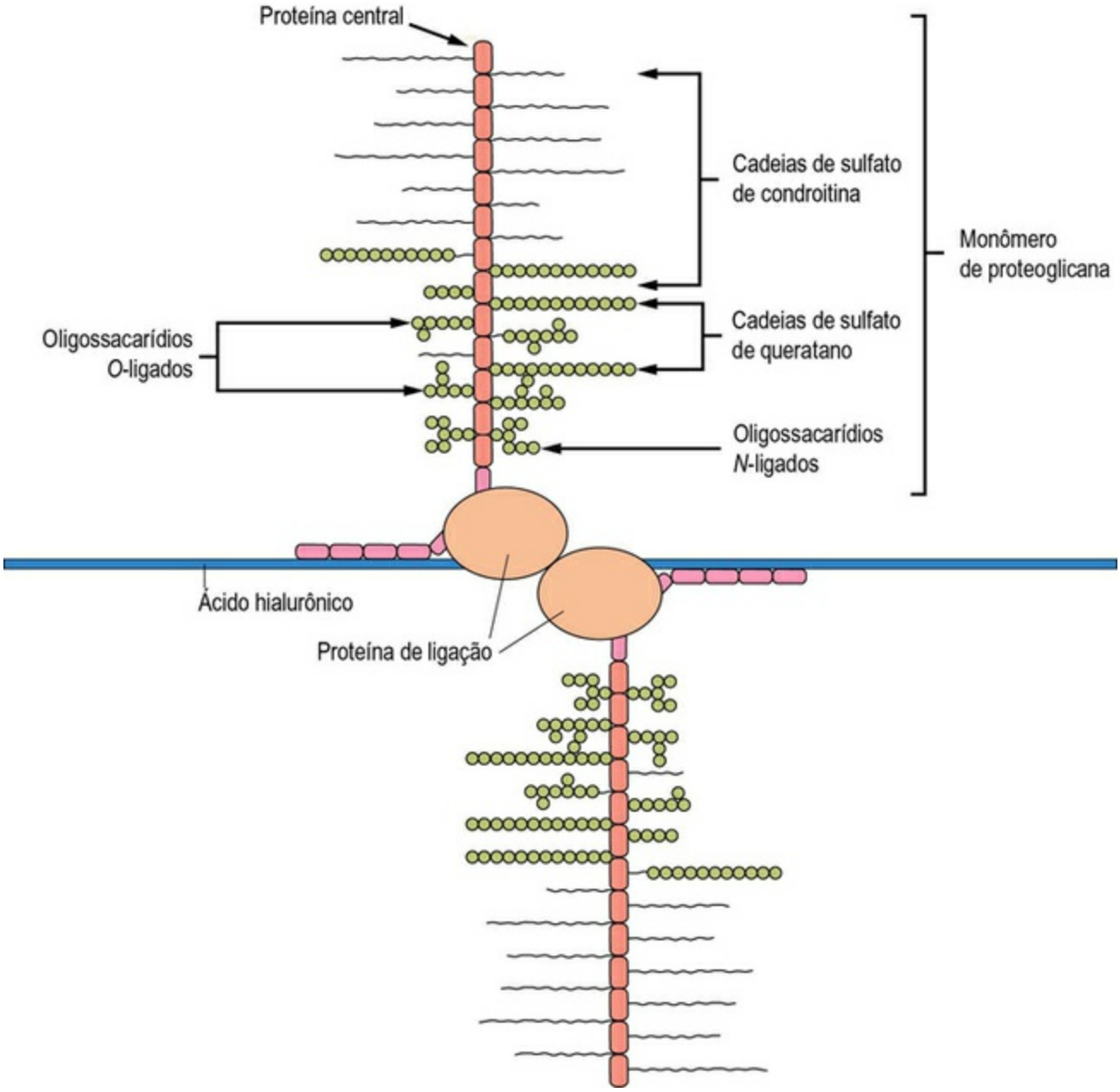


FIG. 29.8 Estrutura do agrecano. As associações entre proteoglicanos e o ácido hialurônico formam uma estrutura de agrecano na matriz extracelular (MEC). A extensão dessa estrutura gera um arranjo tridimensional dos proteoglicanos ligados ao ácido hialurônico, que cria uma matriz rígida ou uma estrutura similar a uma "escova de garrafa", na qual o colágeno e outros componentes da MEC estão embebidos.

Quadro de conceitos avançados

Mecanismos do efeito anticoagulante da heparina

A heparina é um oligossacarídio polianiônico, heterogêneo (3.000-30.000 kDa), ativador da antitrombina III (AT-III) (Cap. 7). A AT-III é um inibidor lento, porém quantitativamente importante da trombina (fator X) e de outros fatores (IX, XI, XII) na cascata de formação do coágulo. Quando a heparina se liga à AT-III, ela converte a AT-III de um inibidor lento em um inibidor rápido das enzimas coagulantes. A heparina interage com um resíduo de lisina na AT- -III e induz a uma mudança conformacional que promove a ligação covalente da AT-III aos centros ativos de serina das enzimas da

coagulação, inibindo assim sua atividade pró-coagulante. Então, a heparina se dissocia do complexo ternário e pode ser reciclada para a anticoagulação.

O menor e mais ativo componente da heparina é um pentassacarídio: (GlcN-[*N*-sulfato-6-*O*-sulfato]-α1,4-GlcUA-β1,4-GlcN-[*N*- -sulfato-3,6-di-*O*-sulfato]-α1,4-IdUA-[2-*O*-sulfato]-α-1,4-GlcN-[*N*- -sulfato-6-*O*-sulfato]), que tem uma K_d de ~10 μM para a ligação à ATIII. A heparina possui uma meia-vida de 30 minutos na circulação, desta forma é normalmente administrada por infusão. A heparina não possui atividade fibrinolítica, portanto ela não hidrolisará coágulos já existentes. Além da sua atividade anticoagulante, a heparina também libera várias enzimas dos sítios de ligação de proteoglicanos na parede vascular, incluindo lipoproteína lipase, que é frequentemente analisada como atividade plasmática da lipoproteína lipase liberada pela heparina ou lipase pós-heparina. A lipoproteína lipase é induzida pela insulina, e a atividade diminuída dessa enzima retarda a remoção *(clearance)* dos quilomícrons e VLDL do plasma, contribuindo para a hipertrigliceridemia no diabetes (Cap. 18).

A estrutura geral da cartilagem pode ser comparada com as colunas verticais fortificadas de concreto reforçado, utilizadas na construção de grandes edifícios, nas quais os vergalhões de aço (fibras colágenas) estão embebidos em uma camada amorfa de cimento (os agregados de proteoglicanos). O colágeno estabiliza a rede de proteoglicanos na cartilagem da mesma forma que os reforçados vergalhões de aço no concreto promovem a resistência estrutural para as paredes de cimento. A estrutura das construções resistentes a terremotos, assim como da MEC, fornece equilíbrio entre a integridade e a flexibilidade.

Embora as quantidades envolvidas sejam baixas, comparadas com aquelas na pele e na cartilagem, órgãos como o fígado, cérebro e os rins também contêm uma variedade de proteoglicanos:

- **Fígado:** o sulfato de heparano é a principal GAG; está presente tanto intracelularmente quanto na superfície celular do hepatócito, e a adesão dos hepatócitos ao seu substrato em cultura de células é mediada, em parte, por estes proteoglicanos.
- **Rim:** mudanças tanto no conteúdo de colágeno quanto no de proteoglicanos na membrana basal renal estão associadas à doença renal diabética. Neste caso, a mudança na estrutura e a carga do agregado de proteoglicanos, conhecido como perlecano, estão associadas a uma mudança na filtração seletiva do glomérulo (Cap. 23).
- **Córnea:** duas populações de proteoglicanos foram identificadas na córnea: uma população que contém sulfato de queratano e outra população, sulfato de dermatano. Estas moléculas apresentam um tamanho hidrodinâmico muito menor do que os grandes proteoglicanos da cartilagem, o que pode ser necessário para a interação dos proteoglicanos da córnea com as fibras colágenas, firmemente agrupadas e orientadas neste tecido transparente. A turvação da córnea na distrofia córnea macular está associada à sulfatação ineficiente da proteoglicana sulfato de queratano I.

Alguns proteoglicanos ou GAGs, especialmente a heparina e o sulfato de heparano, têm importantes papéis fisiológicos na ligação a proteínas ou outras macromoléculas. A heparina serve como um sítio de ligação para proteinases localizadas em grânulos secretórios dos mastócitos. Vários proteoglicanos estão envolvidos na ligação de proteínas e enzimas à parede vascular. Elas podem também funcionar na parede vascular para inibir a formação de coágulos por ativação da antitrombina III (Cap. 7).

Comunicação das células com a matriz extracelular

As integrinas são proteínas da membrana plasmática que se ligam à MEC e transmitem sinais mecânicos entre esta e as proteínas intracelulares

As interações entre as células e a MEC regulam uma vasta diversidade de processos celulares, incluindo a proliferação, migração, diferenciação ou até mesmo a sobrevivência. Foram identificados vários receptores de superfície celular que medeiam essas interações, incluindo as integrinas, os receptores de domínio discoidina, distroglicano e outros. Dentre estes, as **integrinas** parecem ser a forma mais ubíqua de receptores MEC. As integrinas são amplamente expressas em todo o reino animal, desde as esponjas aos humanos. Elas são heterodímeros de cadeias α e β que foram grosseiramente agrupadas em subfamílias com base na cadeia β, que as compõe. Até a data, foram identificadas 18 cadeias α e oito cadeias β em mamíferos. Através de várias combinações de cadeias α e β, foram descritos mais de 20 heterodímeros de integrinas funcionais. A combinação específica de cadeias α e β dita o ligante MEC específico para um heterodímero particular da integrina. Contudo, múltiplos heterodímeros de integrinas podem se ligar a alguns componentes MEC. Por exemplo, o $\alpha_4\beta_1$, o $\alpha_5\beta_1$ e o $\alpha_v\beta_3$ interagem todos com a fibronectina. Em adição a essa complexidade, vários heterodímeros de integrinas se ligam a múltiplos componentes MEC. Por exemplo, o $\alpha_v\beta_3$, que foi originalmente descrito como um receptor de vitronectina, pode interagir não só com a vitronectina mas também com a fibronectina, o fibrinogênio e a osteopontina.

Em uma integrina funcional, tanto as cadeias α quanto as cadeias β atravessam a membrana plasmática (Fig. 29.9). Tipicamente, cada cadeia tem um grande domínio extracelular, um domínio transmembranar único e uma cauda citoplasmática curta. Uma exceção a isso é a proteína β4, que possui uma cauda citoplasmática excepcionalmente longa, com mais de 1.000 aminoácidos. A região extracelular do heterodímero de integrina interage com componentes MEC de uma forma dependente de cátions bivalentes. As integrinas estão em uma posição ótima para transmitir sinais físicos ou mecânicos da MEC para o interior da célula. Esses sinais físicos podem ser distribuídos adicionalmente através da célula pelo citoesqueleto, que contém actina, e em última instância modular a expressão gênica no núcleo. Essa transmissão de sinais físicos através do eixo ECM-integrina-citoesqueleto foi extensivamente estudada e denominada **"tensegridade".** Os sinais físicos da MEC podem também ser convertidos em eventos bioquímicos no citoplasma da célula via integrinas. Ao contrário de outros tipos de

receptores, as integrinas não possuem atividade enzimática própria. No entanto, as integrinas se associam a várias proteínas cinases citoplasmáticas, incluindo a cinase de adesão focal (FAK) e a Src. A ativação de integrinas inicia cascatas enzimáticas através destas cinases associadas, que finalmente levam a alterações no comportamento celular e na expressão gênica.

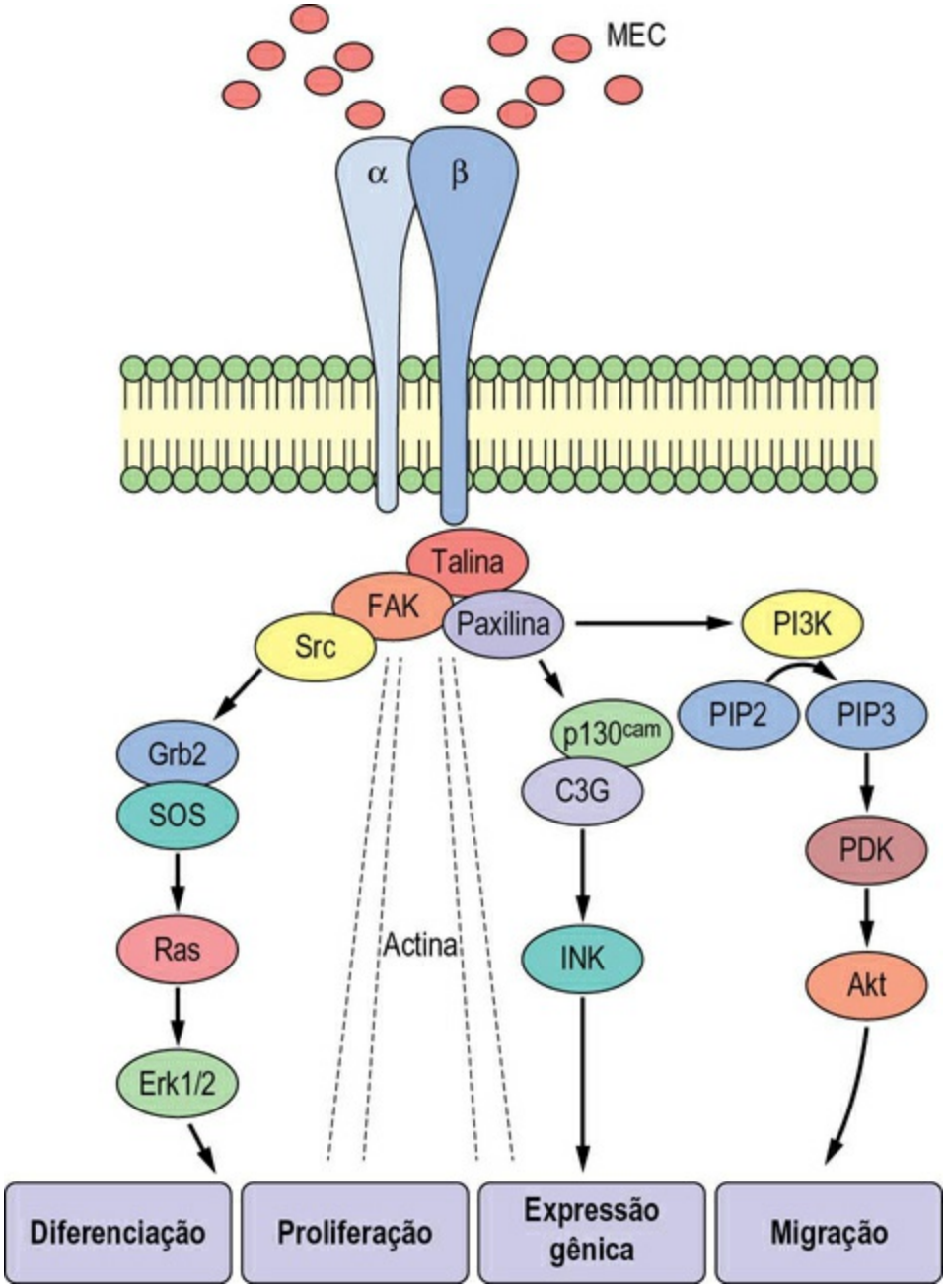


FIG. 29.9 Organização das integrinas. As cadeias α e β atravessam a membrana celular interagindo com a MEC no exterior da célula e com o citoesqueleto e moléculas de sinalização no interior. Dessa maneira, as integrinas podem converter sinais da MEC em eventos bioquímicos e mecânicos no citoplasma que, em última instância, levam a alterações na morfologia e função celulares. As ovais contêm abreviaturas de componentes da complexa cascata de sinalização que transmite informação desde a molécula de integrina até o núcleo da célula.

Quadro de conceitos avançados

Remodelação da matriz

A MEC se encontra em um estado constante de síntese e degradação, reparação e remodelação: por exemplo, durante a migração celular, morfogênese, angiogênese e em resposta à inflamação e à lesão. O *turnover* da MEC é mediado por uma família de **metaloproteinases de matriz (MMPs),** cerca de 30 endoproteinases de zinco com especificidade para diferentes componentes da matriz. A família MMP inclui colagenases, estromelisinas, matrilisinas e elastases; estas enzimas, com amplas especificidades para o substrato, catalisam a degradação do colágeno, agrecano e proteínas acessórias da MEC, como a fibronectina e a laminina.

As MMPs podem ser proteínas integrais da membrana plasmática, podem se ligar à membrana plasmática por uma âncora glicana de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Cap. 28), ou serem secretadas para o espaço extracelular; elas existem como zimogênios até serem ativadas localmente por clivagem proteolítica em resposta a sinais celulares ou enzimas extracelulares, como a trombina e a plasmina, ativadas durante a coagulação sanguínea e a fibrinólise. Tal como na cascata de reações de proteases envolvida na coagulação sanguínea, existem também inibidores tissulares das MMPs, conhecidos como TIMPs, uma família de quatro proteínas que inativam as MMPs e limitam a propagação do dano. O balanço entre a ativação e a inibição das MMPs é crítico para a integridade e função da MEC; alterações na atividade MMP estão associadas a displasias esqueléticas, doença arterial coronariana, artrite e metástase.



Quadro de conceitos avançados

Matriz extracelular e engenharia de tecidos

Ao longo da última década, o interesse na produção de tecidos de substituição através da engenharia de tecidos cresceu consideravelmente. O objetivo final da engenharia de tecidos é o de combinar células e biomateriais apropriados para produzir equivalentes de tecidos que mimetizem tecidos e órgãos normais e possam substituir tecidos lesados ou doentes. Como as propriedades biológicas e mecânicas dos tecidos são determinadas, em parte, pela composição heterogênea e organização da MEC, a produção bem-sucedida de equivalentes de tecidos irá requerer o desenvolvimento de suportes tridimensionais MEC adequados.

Uma abordagem terapêutica atrativa é a combinação de células-tronco indiferenciadas com suportes apropriados e fatores bioquímicos para promover a diferenciação das células ao longo de linhagens particulares, dependendo do tecido de substituição especificamente desejado. As propriedades do suporte MEC, incluindo a composição da MEC, porosidade e propriedades mecânicas, têm importantes efeitos na diferenciação das células-tronco. A cultura de células-tronco mesenquimais em suportes de elevada rigidez tende a promover a formação de tecido semelhante a osso e a formação de osteoblastos, enquanto a cultura das mesmas células-tronco em suportes menos rígidos resulta na formação de células de cartilagem ou condroblastos.

Estes e outros estudos ilustram que os estímulos físicos e mecânicos da MEC são importantes na regulação da diferenciação das células-tronco. Os avanços na engenharia de tecidos e a produção de tecidos de substituição implicarão uma compreensão profunda da MEC normal e patológica.

Resumo

- A MEC contém um arranjo complexo de colágenos formadores de rede e fibrilares, fibras elásticas, bem como uma matriz rígida e gelatinosa de proteoglicanos e um número de glicoproteínas que medeiam a interação destas moléculas umas com as outras e com a superfície celular.
- As interações entre os componentes da MEC proporcionam estrutura, estabilidade e elasticidade para a MEC, fornecendo uma rota para a comunicação entre os meios intra e extracelulares nos tecidos.
- A heterogeneidade dos componentes proteicos e dos carboidratos da MEC promove a grande diversidade na estrutura e na função da MEC em vários tecidos.

Questões para aprendizagem

1. Compare a estrutura da heparina, seu mecanismo de ação, sua rota e frequência de administração com outros anticoagulantes comuns, como a aspirina e derivados de cumarina.
2. Discuta os fatores que promovem a renovação dos componentes da MEC como parte do crescimento normal e desenvolvimento, e nas doenças como a artrite reumatoide.
3. Revise as consequências dos defeitos genéticos na sulfatação dos proteoglicanos.

Leituras sugeridas

Couchman, J. R., Pataki, C. A. An introduction to proteoglycans and their localization. *J Histochem Cytochem*. 2012; 60:885–897.

Hanein, D., Horwitz, A. R. The structure of cell-matrix adhesions: the new frontier. *Curr Opin Cell Biol*. 2012; 24:134–140.

Ingber, D. E. Tensegrity-based mechanosensing from macro to micro. *Prog Biophys Mol Biol*. 2008; 97:163–179.

Kadler, K. E., Baldock, C., Bella, J., Boot-Handford, R. P. Collagens at a glance. *J Cell Science*. 2007; 120:1955–1958.

Kock, L., van Donkelaar, C. C., Ito, K. Tissue engineering of functional articular cartilage: the current status. *Cell Tissue Res*. 2012; 347:613–627.

Murphy, G. Tissue inhibitors of metalloproteinases. *Genome Biol*. 2011; 12:233. [doi: 10.1186/gb-2011-12-11-233].

Stupack, D. G. The biology of integrins. *Oncology*. 2007; 21:6–12.

Yamauchi, M., Sricholpech, M. Lysine post-translational modifications of collagen. *Essays Biochem*. 2012; 52:113–133.

Sites

Collagen in disease: www.dupuytrenfoundation.org

Marfan's syndrome: www.marfan.org

Mucopolysaccharidoses: www.ninds.nih.gov/health

CAPÍTULO 30

Papel do Fígado no Metabolismo

Alan F. Jones

Objetivos

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Discutir a participação do fígado no metabolismo de carboidrato e, em particular, seu papel na produção endógena de glicose.
- Discutir o papel do fígado no metabolismo de lipídios.
- Delinear as alterações na síntese de proteínas hepáticas que se realiza durante a reação de fase aguda.
- Descrever os mecanismos de proteólise mediados pela ubiquitina.
- Descrever a via de síntese do heme.
- Descrever o metabolismo de bilirrubina e os principais tipos de icterícia.
- Comentar o mecanismo de hepatotoxicidade de fármacos e álcool.

Introdução

O fígado tem um papel central no metabolismo tanto por causa de sua localização anatômica quanto de suas muitas funções bioquímicas

O fígado recebe sangue venoso do intestino: assim, todos os produtos da digestão, fármacos ingeridos e outros xenobióticos o alcançam e podem ser adicionalmente metabolizados antes de entrarem na circulação sistêmica. As células hepáticas parenquimais, os **hepatócitos,** têm uma imensa gama de funções sintéticas e catabólicas, que estão resumidas na Tabela 30.1.

Tabela 30.1

Funções das células parenquimais e suas alterações na doença hepática

Função	Marcadores plasmáticos de dano
Catabolismo do heme	bilirrubina
Metabolismo de carboidrato	↓ glicose
Síntese proteica	↓ albumina tempo de protrombina prolongado
Catabolismo proteico	↑ amônia ↓ ureia
Metabolismo lipídico	↑ colesterol ↑ triglicérides
Metabolismo de fármacos	meia-vida biológica do fármaco
Metabolismo de ácido biliar	↑ ácidos biliares

O fígado exerce papéis importantes no metabolismo de carboidrato, lipídio e aminoácido, na síntese e quebra de proteínas plasmáticas, e no armazenamento de vitaminas e metais. Ele também tem a capacidade de metabolizar, e então desintoxicar, uma infinidade de xenobióticos. O fígado também tem uma função excretória, na qual produtos dos resíduos metabólicos são excretados em um sistema de ramificação de ductos conhecido como **árvore biliar,** que, por sua vez, drena para o duodeno; os constituintes biliares são então excretados nas fezes.

O fígado é o maior órgão do organismo e tem uma capacidade de reserva metabólica substancial

A doença moderada pode não causar sintomas e ser somente detectada com alterações bioquímicas no sangue. No entanto, o paciente com doença hepática grave tem uma pigmentação amarela da pele **(icterícia),** hematomas aparecem facilmente, pode **sangrar abundantemente,** tem um abdome distendido com fluido **(ascite),** e pode estar confuso ou inconsciente **(encefalopatia hepática)** (Fig. 30.1). Este capítulo descreverá as funções metabólicas especializadas do fígado e as anormalidades que ocorrem na doença hepática.

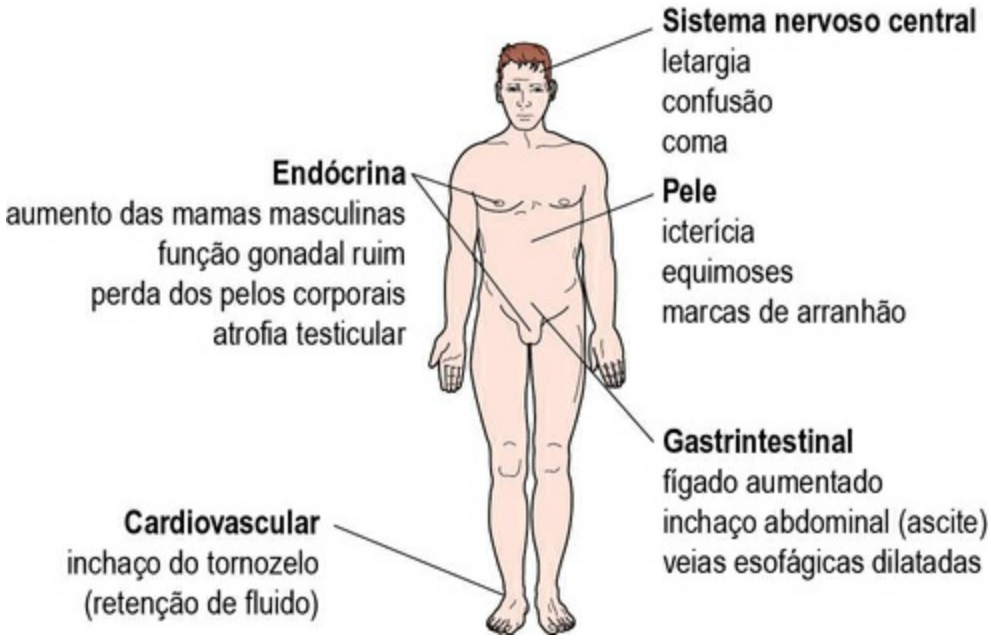


FIG. 30.1 Características clínicas da doença hepática grave.

Estrutura do fígado

O fígado é o maior órgão sólido no corpo e, nos adultos, pesa cerca de 1.500 g. Aproximadamente, 75% de seu fluxo sanguíneo é suprido pela veia porta, que se origina do intestino. A artéria hepática fornece a porção restante de seu sangue. O sangue que deixa o fígado entra no sistema venoso periférico na veia hepática. A componente biliar do fígado compreende a vesícula biliar e os ductos biliares.

A estrutura do fígado facilita a troca de metabólitos entre os hepatócitos e o plasma

Ao microscópio, a substância do fígado é composta por um número muito elevado de hepatócitos dispostos em lóbulos poliédricos (Fig. 30.2). As tríades portais, nos "cantos" destes poliedros, contêm ramificações da veia porta, artéria hepática e ductos biliares interlobulares. Os sinusoides sanguíneos surgem a partir das ramificações terminais da veia porta e se interligam e entrelaçam através dos hepatócitos antes de se juntarem à veia lobular central que, por sua vez, flui possivelmente para a veia hepática.

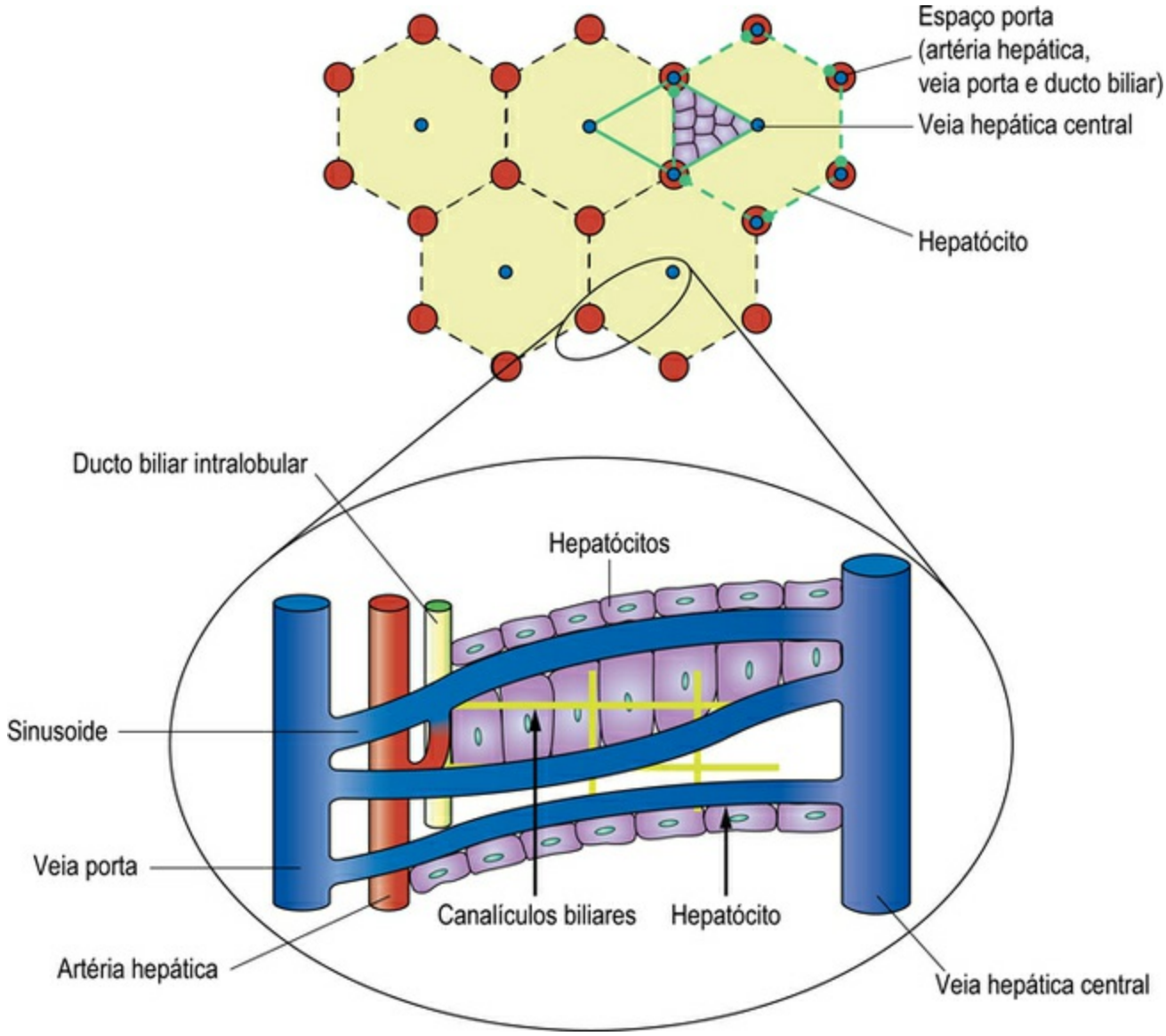


FIG. 30.2 Estrutura do fígado.

Os sinusoides estão delineados por dois tipos celulares. Os primeiros são as **células endoteliais,** que estão fracamente conectadas umas às outras, deixando numerosas lacunas. Não existe membrana basal entre as células endoteliais e os hepatócitos. O segundo tipo de células sinusoidais, conhecidas como **células de Kupffer,** são fagócitos mononucleares; estes são geralmente encontrados nas lacunas entre as células endoteliais.

Estas disposições anatômicas facilitam a troca de metabólitos entre os hepatócitos e o plasma, permitem que os hepatócitos recebam um fornecimento arterial e possibilitam que os produtos de excreção do metabolismo hepático destinados à excreção biliar entrem nos ductos biliares.

Fígado e metabolismo de carboidratos

O fígado desempenha um papel central no metabolismo da glicose, mais especificamente na manutenção da concentração de glicose circulante (Caps. 13 e 21). Essa função depende tanto de sua capacidade de armazenar um estoque de glicose como glicogênio, quanto de sintetizar glicose a partir de fontes que não são carboidratos, outras que não os

lipídios, através da gliconeogênese.

Dependendo das condições metabólicas, o fígado pode captar ou produzir glicose

O fígado possui glicose-6-fosfatase, que permite a liberação de glicose livre para o sangue. Embora o músculo armazene mais glicogênio do que o fígado, não possui glicose-6-fosfatase e, como tal, não pode contribuir diretamente com glicose para o sangue. O rim tem capacidade de sintetizar glicose-6-fosfato *de novo* pela gliconeogênese e possui atividade de glicose-6-fosfatase, mas, quantitativamente, ele contribui muito menos do que o fígado (Cap. 23). Além disso, os rins não armazenam glicogênio.

Certos órgãos, em particular o cérebro, dependem da glicose como fonte de energia, pelo que o fígado do adulto, no estado de jejum, libera cerca de 9 g de glicose para o sangue a cada hora, com o objetivo de manter a concentração sanguínea de glicose. Os substratos para a gliconeogênese derivam do lactato liberado pela glicólise nos tecidos periféricos e da desaminação hepática de aminoácidos (principalmente da alanina) gerados por proteólise do músculo esquelético (Cap. 21).

Fígado e metabolismo proteico

A maioria das proteínas plasmáticas é sintetizada no fígado

A doença hepatocelular pode alterar a síntese proteica tanto quantitativa como qualitativamente. A **albumina** é a proteína mais abundante no sangue e é sintetizada exclusivamente pelo fígado (Cap. 4). Na doença hepática ocorre comumente uma baixa concentração plasmática de albumina. Este é, contudo, um indicador limitado da função sintética hepática porque, na doença sistêmica (que acompanha frequentemente a doença hepática), existe uma permeabilidade endotelial vascular que permite a perda de albumina para o espaço intersticial.

Um índice melhor da função sintética do hepatócito é a produção dos fatores de coagulação II, VII, IX e X

Todos os fatores de coagulação após a tradução dão suporte à γ−carboxilação em resíduos de glutamil específicos, permitindo que eles se liguem ao cálcio. Como um grupo, sua concentração funcional pode ser rapidamente avaliada no laboratório pela medida do tempo de protrombina (PT; Cap. 7).

O fígado também sintetiza a maior parte das globulinas α e β do plasma. Suas concentrações plasmáticas mudam na doença hepática e na doença sistêmica; no último caso, essas mudanças formam uma parte da **resposta de fase aguda.**

A resposta a um ataque agudo está associada a grandes mudanças na síntese proteica hepática

A resposta da fase aguda é um termo que engloba todas as alterações sistêmicas que ocorrem em resposta à infecção ou inflamação (Cap. 4). O fígado sintetiza um número de "proteínas de fase aguda", que têm sido definidas como aquelas cujas concentrações

plasmáticas se alteram em mais de 25% em uma semana de dano inflamatório ou infeccioso. A produção dessas proteínas é estimulada por citocinas pró-inflamatórias liberadas pelos macrófagos e destas, a interleucina 1 (IL-1), IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF) têm um papel central. As proteínas de fase aguda têm inúmeras funções diferentes. As **proteínas de ligação,** opsoninas, tal como a proteína C-reativa (CRP), se ligam a macromoléculas liberadas pelo dano tecidual ou agentes infecciosos e estimulam sua fagocitose (Cap. 38). Os **fatores de complemento** também promovem a fagocitose de moléculas estranhas. As **proteases inibidoras,** tais como a α_1-antitripsina e α_1-antiquimotripsina, inibem enzimas proteolíticas. As duas últimas também estimulam o crescimento fibroblástico e a produção de tecido conjuntivo necessário para o reparo e a resolução da lesão.

Um suprimento substancial de aminoácidos é necessário como substrato para esse aumento na síntese proteica hepática, e esta é proveniente da proteólise do músculo esquelético. O TNF e a IL-1 estão novamente envolvidos, estimulando a degradação de proteínas intracelulares específicas pelo sistema ubiquitina-proteasoma (ver a seguir).

Degradação proteica pelo sistema ubiquitina-proteasoma

A ubiquitina marca proteínas intracelulares para a degradação pelo proteasoma

O *turnover* de proteínas hepáticas é altamente controlado, o que permite às vias metabólicas se adaptarem às mudanças das circunstâncias fisiológicas. As células dos mamíferos possuem vários sistemas proteolíticos.

As proteínas plasmáticas e os receptores de membrana são endocitados e então hidrolisados pelas proteases ácidas dentro dos lisossomos. As proteínas intracelulares, por sua vez, são degradadas em estruturas conhecidas como proteasomas pelo então chamado sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) (Cap. 33). As descobertas da ubiquinilação proteica foram agraciadas com o Prêmio Nobel em química em 2003. O UPS é importante na ativação da via pró-inflamatória do NFκB e a função do UPS é modificada pelas espécies reativas de oxigênio (Cap. 37; Fig. 34.10).

Remoção de nitrogênio

O ciclo da ureia é essencial para a remoção do nitrogênio gerado pelo metabolismo de aminoácido

O catabolismo de aminoácidos gera amônia (NH_3) e íons amônio (NH_4^+). A amônia é tóxica, particularmente para o sistema nervoso central (SNC). A maior parte da amônia é detoxificada em seus sítios de formação pela amidação de glutamato à glutamina, que é principalmente derivada do músculo e usada como uma fonte de energia pelos enterócitos. O nitrogênio remanescente entra pela veia porta ou como amônia ou como alanina, ambas usadas pelo fígado para a síntese de **ureia** (Cap. 19).

O comprometimento na excreção de amônia causa dano cerebral

O ciclo da ureia é a principal via pela qual o nitrogênio não aproveitado é excretado, como descrito no Capítulo 19. Nos recém-nascidos, defeitos hereditários de algumas enzimas do ciclo da ureia levam à **hiperamonemia,** o que prejudica a função do cérebro, causando encefalopatia. Tais problemas surgem nas primeiras 48 horas de vida e, inevitavelmente, são agravados pelos alimentos ricos em proteínas, tal como o leite (Quadro Clínico p. 243).

Síntese do heme

O heme é um constituinte da hemoglobina, mioglobina e citocromos

O heme é sintetizado na maioria das células do corpo. O fígado é a principal fonte não eritrocítica da sua síntese. O heme é uma porfirina, um composto cíclico que contém quatro anéis pirrólicos unidos por pontes de metileno. Ele é sintetizado da glicina e da succinil-coenzima A, que se condensam para formar o 5-aminolevulinato (5-ALA). Essa reação é catalisada pela 5-ALA sintase, localizada na mitocôndria, e é a etapa limitante da síntese do heme. Subsequentemente, no citosol, duas moléculas de 5-ALA se condensam para formar uma molécula contendo um anel pirrol, o porfobilinogênio (PBG). Assim, quatro moléculas PBG combinam-se para formar um composto tetrapirrólico linear que se cicliza para produzir o uroporfirinogênio III e, em seguida, o coproporfirinogênio III. As etapas finais da via ocorrem novamente na mitocôndria, onde uma série de descarboxilação e oxidação das cadeias laterais no uroporfirinogênio III produz a protoporfirina IX. Na etapa final, o ferro (Fe^{2+}) é adicionado pela ferroquelatase à protoporfirina IX para formar o heme. O grupo heme controla a taxa de sua síntese através de inibição por retroalimentação da 5-ALA sintase (Fig. 30.3).

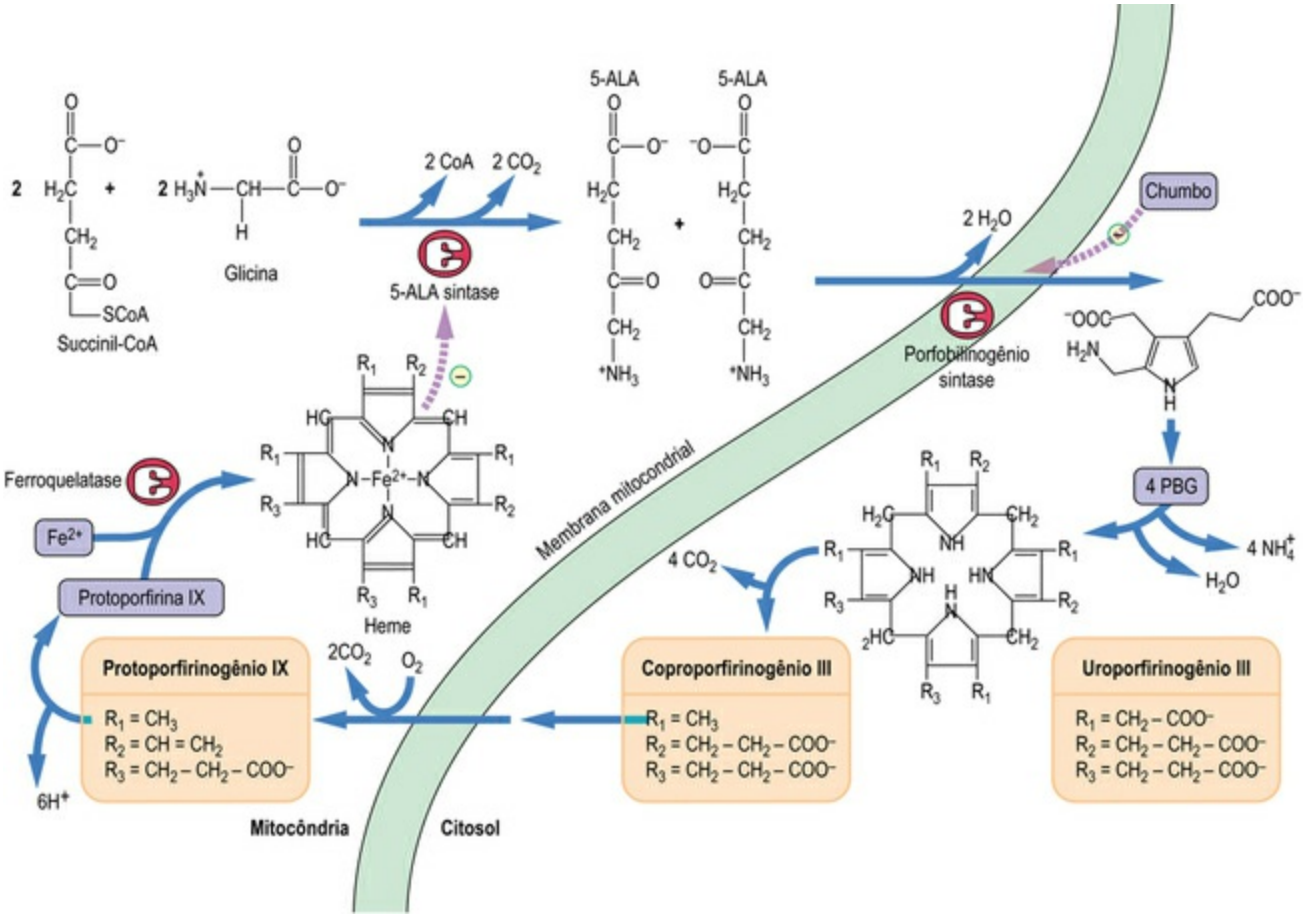


FIG. 30.3 A via de síntese do heme.
Parte da via está localizada na mitocôndria, e parte no citosol. ALA, 5-aminolevulinato; PBG, porfobilinogênio. A hemoglobina é discutida no Capítulo 5.

Metabolismo da bilirrubina

Excesso de bilirrubina causa icterícia

A bilirrubina é o produto catabólico do heme. Cerca de 75% de toda a bilirrubina é derivada da hemoglobina de hemácias senescentes, que são fagocitadas pelas células mononucleares do baço, medula óssea e fígado (células reticuloendoteliais). Nos adultos normais, o nível diário de bilirrubina é de 250-350 mg. A estrutura anelar do heme é clivada oxidativamente em biliverdina pela heme oxigenase, um citocromo P-450 (ver adiante). A biliverdina é, por sua vez, reduzida enzimaticamente a bilirrubina (Fig. 30.4). A concentração plasmática normal de bilirrubina é menor que 21 μmol/L (1,2 mg/dL). As concentrações aumentadas (maiores que 50 μmol/L ou 3 mg/dL) são rapidamente reconhecidas clinicamente, porque a bilirrubina dá a cor amarela à pele (icterícia). Anormalidades no metabolismo da bilirrubina são importantes indicadores no diagnóstico da doença hepática.

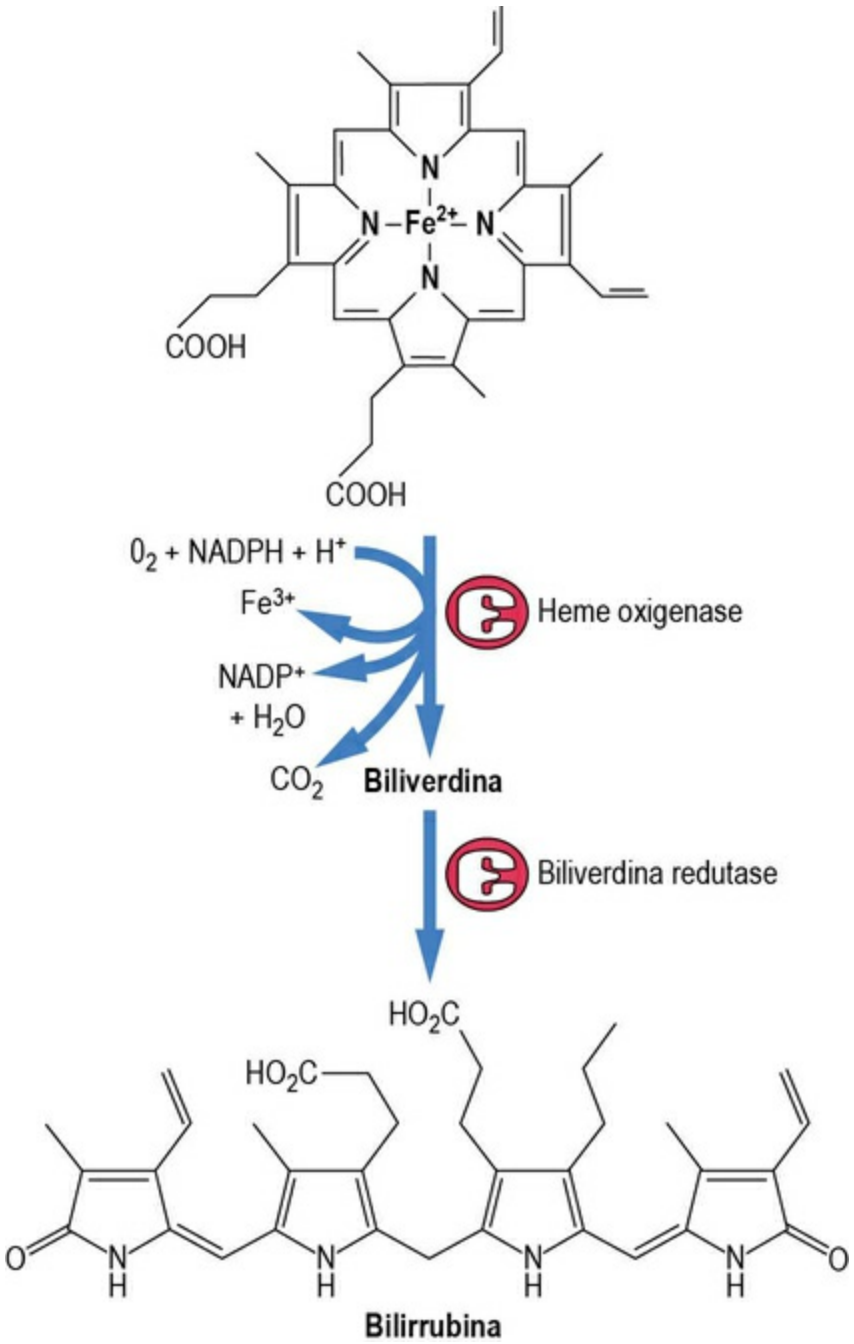


FIG. 30.4 Degradação do heme em bilirrubina.

Quadro de conceitos avançados

Porfirias

Defeitos na via de síntese do heme levam a distúrbios raros conhecidos como porfirias. As diferentes porfirias são causadas por deficiências de diferentes enzimas na via biossintética, começando pela 5-ALA sintase e terminando com a ferroquelatase. As porfirias são classificadas como hepática ou eritropoética dependendo do órgão primário afetado.

Três porfirias são conhecidas como porfirias agudas e podem ser uma das causas de admissões emergenciais com dor abdominal (a qual necessita ser diferenciada de várias causas cirúrgicas). Elas também causam sintomas neuropsiquiátricos. A **porfiria**

aguda intermitente (AIC) é causada pela deficiência da hidroximetilbilano sintase, uma enzima que converte o PBG em um tetrapirrol linear; neste distúrbio, as concentrações de 5-ALA e PBG aumentam no plasma e na urina. A **coproporfiria hereditária** se deve a um defeito na conversão de coproporfirinogênio III em protoporfirinogênio III (copro-oxidase). A terceira forma da porfiria aguda é a **porfiria variegata,** na qual as manifestações clínicas são muito similares à AIC.

Outras porfirias, tais como a porfiria cutânea tardia, apresentam-se clinicamente como uma sensibilidade da pele à luz (fotossensibilidade) que pode causar desfiguração e formação de cicatriz. Além disso, a via é inibida pelo chumbo na fase da porfobilinogênio sintase.

A bilirrubina é metabolizada pelos hepatócitos e excretada na bile

Enquanto a biliverdina é hidrossolúvel, a bilirrubina, paradoxalmente, não o é. Deste modo, ela tem de ser metabolizada adicionalmente antes da excreção (Fig. 30.5). A bilirrubina produzida pelo catabolismo do grupo heme nas células reticuloendoteliais é transportada no plasma ligada à albumina. A captação hepática da bilirrubina é mediada por um carreador de membrana e pode ser inibida competitivamente por outros ânions inorgânicos. A hidrofilia da bilirrubina é aumentada por esterificação, conhecida geralmente como conjugação, de uma ou de ambas cadeias laterais de ácidos carboxílicos com ácido glicurônico, xilose ou ribose. O diéster glicuronídio é o principal conjugado e sua formação é catalisada pela uridina difosfato (UDP)-glicuronil transferase. A bilirrubina conjugada é hidrossolúvel e pode ser secretada pelo hepatócito nos canalículos biliares. Se este processo excretor for comprometido e se, em resultado, o paciente ficar com icterícia, alguma bilirrubina conjugada pode ser perdida na urina, conferindo-lhe uma cor caracteristicamente escura.

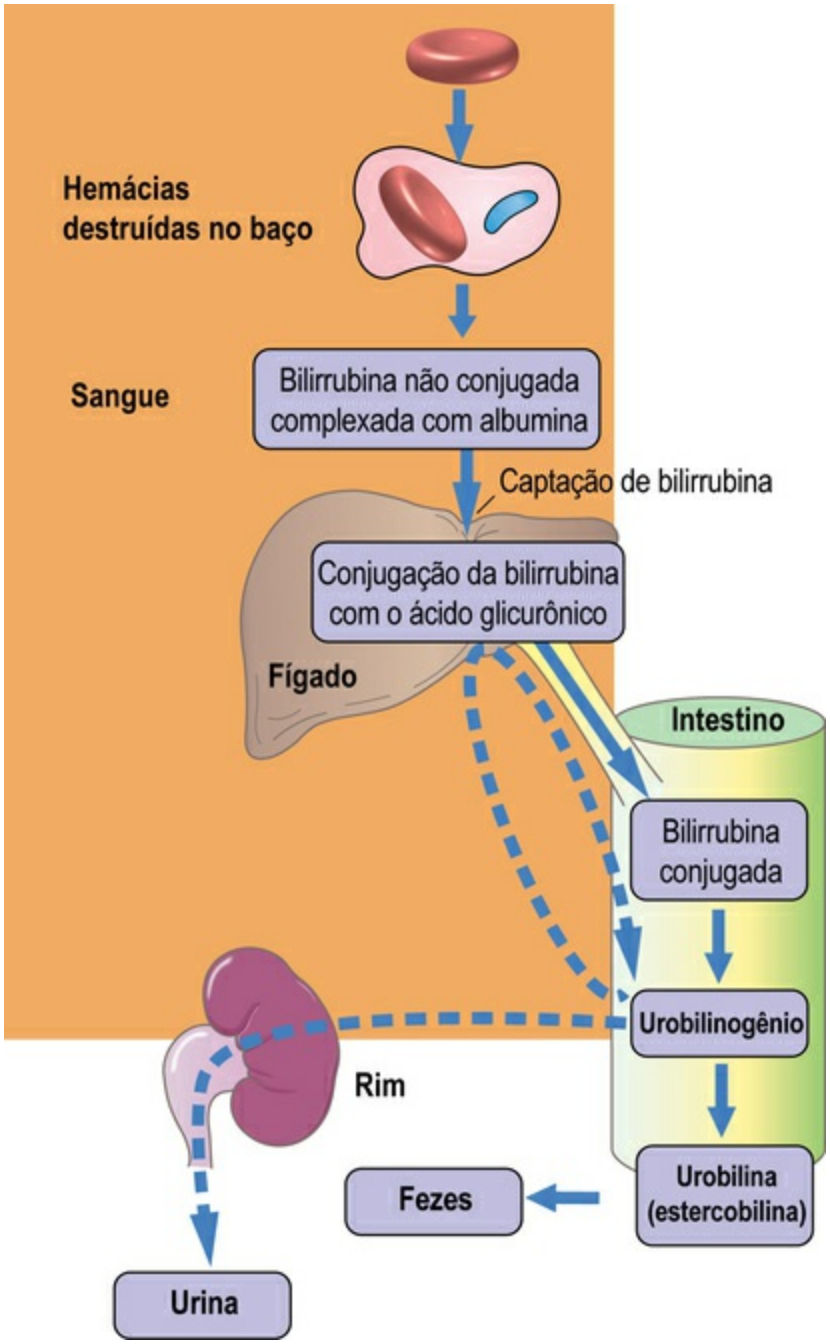


FIG. 30.5 Metabolismo normal da bilirrubina.

A bilirrubina conjugada no intestino é catabolizada por bactéria para formar estercobilinogênio, também conhecido como urobilinogênio fecal, que é incolor. Na oxidação, contudo, o estercobilinogênio forma a estercobilina (também conhecida como urobilina fecal), que é colorida; a maior parte da estercobilina é responsável pela cor das fezes. Alguma estercobilina pode ser reabsorvida do intestino e então ser reexcretada ou pelo fígado ou pelos rins.

Ácidos biliares e metabolismo do colesterol

Os ácidos biliares são elementos-chave no metabolismo de gordura

Os ácidos biliares são sintetizados nos hepatócitos e têm um efeito semelhante ao detergente, solubilizando os lipídios biliares e emulsificando a gordura da dieta no intestino para facilitar sua digestão. Seu metabolismo está descrito nos Capítulos 10 e 17.

A bile é também a única via de excreção do colesterol do organismo (Caps. 17 e 18).

Metabolismo de fármacos

A baixa especificidade de algumas enzimas hepáticas ao substrato produz ampla capacidade para o metabolismo de fármacos

A maioria dos fármacos é metabolizado no fígado. Entre outros efeitos, esse metabolismo hepático normalmente aumenta a hidrofilia dos fármacos e, portanto, a suscetibilidade de serem excretados pelos rins ou na bile. Geralmente, os metabólitos dos fármacos são menos ativos do que as fármacos que os originaram; contudo, alguns fármacos são inativos quando administrados (pró-fármacos), mas são convertidos em suas formas ativas como resultado do processamento hepático. Os sistemas hepáticos metabolizadores de fármacos precisam atuar em uma gama infinita de moléculas que podem ser encontradas no ambiente; isso é conseguido pelo fato de as enzimas envolvidas terem baixa especificidade para o substrato.

O metabolismo dos fármacos ocorre em duas fases

A fase I é a adição de grupo polar: a polaridade do fármaco aumenta pela oxidação ou hidroxilação catalisada por uma família de oxidases citocromo P-450 microssomais.

A fase II é a conjugação: as enzimas citoplasmáticas conjugam os grupos funcionais introduzidos nas reações da primeira fase mais frequentemente pela glicuronidação ou sulfação, e também acetilação e metilação.

Três das 12 famílias de genes do citocromo P-450 compartilham a responsabilidade pelo metabolismo de fármacos

As enzimas citocromo P-450 são proteínas que contêm heme e que estão justapostas com a NADH: citocromo P-450 redutase. Elas estão presentes no retículo endoplasmático. A maior parte do metabolismo associado à superfamília do citocromo P-450 acontece no fígado, mas estas enzimas estão também presentes no epitélio do intestino delgado. A sequência de reação catalisada por estas enzimas é mostrada na Figura 30.6. Existem 12 famílias de genes do citocromo P-450, das quais três, denominadas *CYP1*, *CYP2* e *CYP3*, são responsáveis pela maior parte da fase I do metabolismo de fármacos. Na verdade, seis enzimas, CYP1A2, CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 e CYP2E1, são responsáveis por aproximadamente 90% do metabolismo de fármacos. A CYP3A4 é uma das enzimas citocromo P-450 mais importantes.

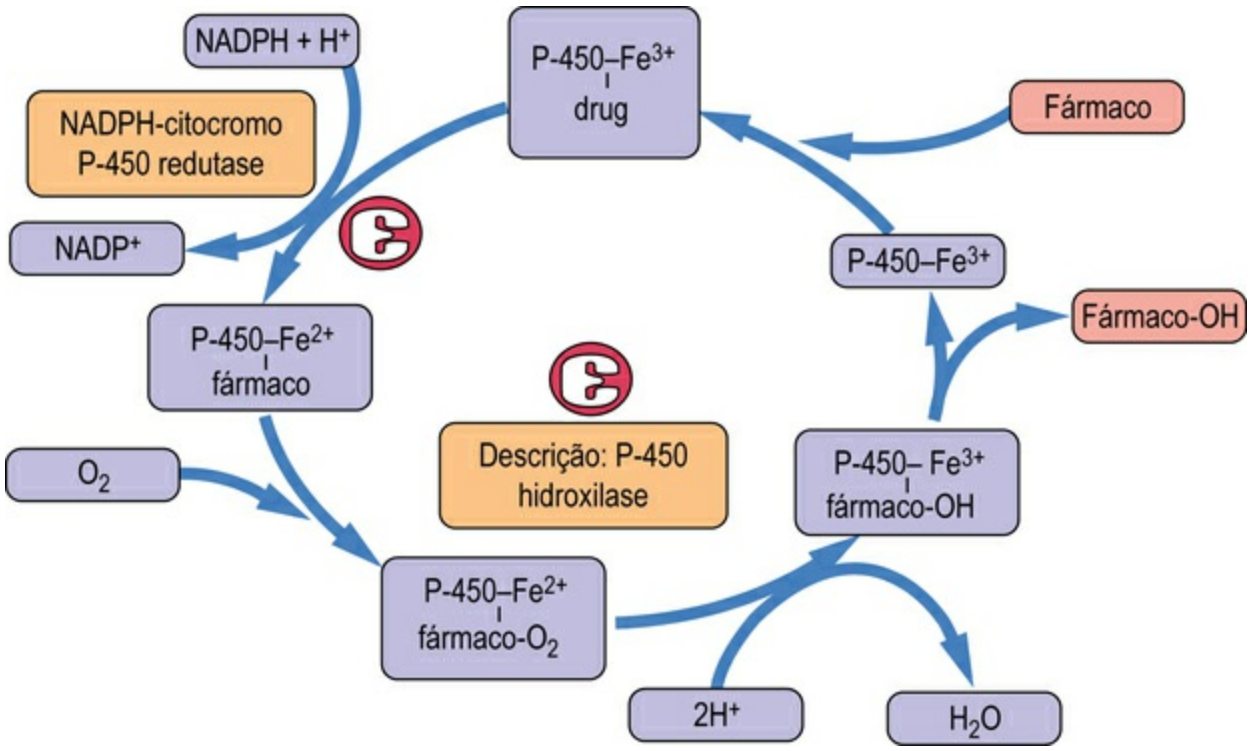


FIG. 30.6 O papel do sistema citocromo P-450 no metabolismo de fármacos.

A indução e a inibição competitiva das enzimas do citocromo P-450 são mecanismos de interação entre fármacos

A síntese de citocromos P-450 é induzida por certos fármacos e outros agentes xenobióticos: isso aumenta a velocidade de reações da fase I. Por sua vez, os fármacos que formam um complexo relativamente estável com o citocromo P-450 inibem o metabolismo de outros fármacos, que são normalmente substratos para aquele citocromo. Por exemplo, a CYP1A2 metaboliza, entre outras, a cafeína e a teofilina. Isto pode ser inibido pelo suco de toranja, que contém uma substância conhecida como naringina, ou pelo antibiótico ciprofloxacina. Quando uma pessoa toma qualquer uma das substâncias inibidoras, os substratos normais para a CYP1A2 são metabolizados mais lentamente e seus níveis plasmáticos aumentam.

Durante a terapia imunossupressora, a dose da ciclosporina imunossupressora pode necessitar ser reduzida até 75% se o paciente toma o fármaco antifúngico cetoconazol (Wilkinson, em Leituras Sugeridas). De outra forma, podem ocorrer reações adversas.

Os fármacos que levam à indução ou repressão das enzimas CYP3A frequentemente atuam por meio do mecanismo do receptor nuclear. Eles se combinam com receptores nucleares (isto é, no caso da CYP3A4, o receptor X pregnano, PXR), que então formam heterodímeros com receptores X retinoides (Cap. 17). Tais complexos aumentam a síntese da CYP3 por ligação aos elementos-resposta no promotor do gene.

Os polimorfismos dos genes do citocromo P-450 determinam resposta a muitos fármacos

A variação alélica que afeta a atividade catalítica do citocromo P-450 também afetará a atividade farmacológica dos fármacos. O melhor exemplo descrito de tal polimorfismo é aquele da *CYP2D6* do citocromo P-450, que foi reconhecido inicialmente em 5-10% dos

indivíduos normais, os quais foram notados ser lentos para debrisoquina hidroxilato, um fármaco redutor de pressão sanguínea que agora é pouco usado. No entanto, a CYP2D6 também metaboliza um número significativo de outros fármacos comumente usados, de modo que o "polimorfismo debrisoquina" continua significativo clinicamente.

A terapia antiplaquetária com clopidogrel é o padrão de cuidados atual para os pacientes com doença arterial coronariana em revascularização. No entanto, aproximadamente 25% dos pacientes experimentam uma resposta antiplaquetária subterapêutica. O clopidogrel é um pró-fármaco que sofre biotransformação hepática pela CYP2C19 em seu metabólito ativo. Vários estudos reportaram que portadores de um alelo variante CYP2C19 exibem uma capacidade consideravelmente menor de transformar o clopidogrel em seu metabólito ativo e estão, portanto, em risco significativamente mais elevado de eventos cardiovasculares adversos. Como consequência disso, nos Estados Unidos, a FDA alterou recentemente a informação de prescrição do clopidogrel para salientar o impacto do genótipo CYP2C19 na resposta clínica ao clopidogrel.

A genotipagem dos citocromos P-450 para identificar polimorfismos genéticos relevantes pode se tornar mais comum, na tentativa de personalizar a resposta do indivíduo a um fármaco particular.

Hepatotoxicidade dos fármacos

Os fármacos que exercem seus efeitos tóxicos no fígado podem, então, fazê-lo pela produção hepática de um metabólito tóxico. A toxicidade medicamentosa pode ocorrer em todos os indivíduos expostos a uma concentração suficiente de um fármaco específico. No entanto, um fármaco pode ser tóxico em alguns indivíduos em concentrações normalmente toleradas pela maioria dos outros pacientes. Esse fenômeno é conhecido como toxicidade medicamentosa idiossincrática e pode ser devido a uma causa genética ou imunológica.

O fármaco acetaminofeno (paracetamol), prescrito frequentemente, em excesso é hepatotóxico

O acetaminofeno é amplamente usado como analgésico. Tomado em doses terapêuticas usuais, ele é conjugado com o ácido glicurônico ou sulfato, que é então excretado pelos rins. Na *overdose*, a capacidade destas vias de conjugação é assoberbada e o acetaminofeno é oxidado pelo citocromo P-450 CYP3A4 hepático em *N*-acetil benzoquinoneimina (NABQI), que pode causar a peroxidação dos lipídios de membrana mediada por radical livre e, consequentemente, um dano hepatocelular. O NABQI pode ser desintoxificado pela conjugação com a glutationa, mas na *overdose* de acetaminofeno, os estoques de glutationa também se tornam esgotados, causando hepatotoxicidade (Fig. 30.7). Terapeuticamente, um composto sulfidril, *N*-acetil cisteína (NAC), é frequentemente usado como antídoto para o envenenamento por acetaminofeno. Ele promove a desintoxicação do NABQI pela via da glutationa e também retira os radicais livres. O risco de hepatotoxicidade pode ser previsto com segurança a partir da dosagem

da concentração plasmática de acetaminofeno relativamente ao tempo decorrido desde a *overdose*, e NAC pode ser administrada aos pacientes em risco de dano hepático. A quantificação de paracetamol é, desta maneira, um dos exames emergenciais oferecidos pelos laboratórios clínicos.

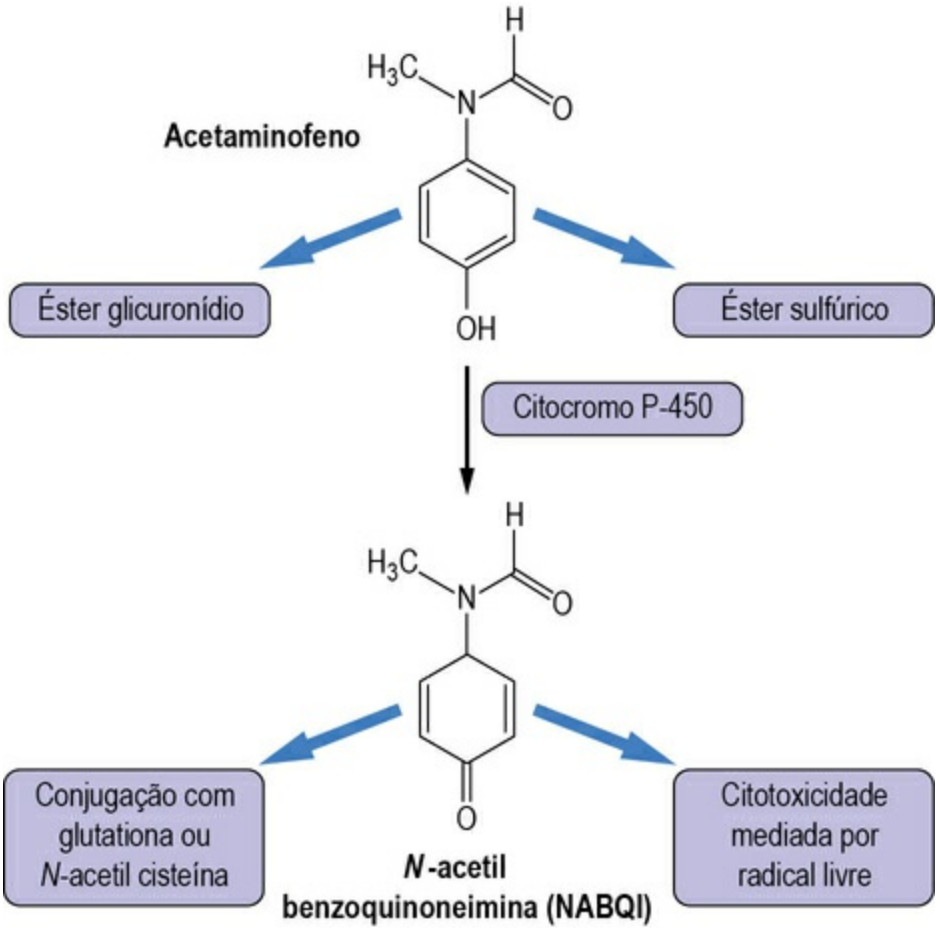


FIG. 30.7 Metabolismo de acetaminofeno (paracetamol).

Álcool

O excesso de álcool é a principal causa de doença hepática

A ingestão excessiva de álcool etílico (etanol) continua sendo a causa mais comum de doença hepática no mundo ocidental. O etanol pode provocar a deposição excessiva de gordura no fígado **(esteatose alcoólica), hepatite** ou finalmente **fibrose** (conhecida como **cirrose**), que, por sua vez, leva à **falência hepática.** Existem mais de 25.000 mortes anualmente associadas à doença hepática nos Estados Unidos, e 40% delas estão relacionadas à cirrose alcoólica (ver Donohue em Leituras Sugeridas).

O etanol é oxidado no fígado, principalmente pela álcool desidrogenase (ADH), para formar acetaldeído, que é, por sua vez, oxidado pela aldeído desidrogenase (ALDH) em acetato. A nicotinamida adenina dinucleotídio (NAD^+) é o cofator para ambas as oxidações, sendo reduzida a NADH. Um citocromo P-450, CYP2E1, também contribui para a oxidação do etanol, mas é quantitativamente menos importante do que a via da

ALD-ALDH. O dano hepático nos pacientes que abusam do álcool pode surgir da toxicidade do acetaldeído, que forma adutos-base de Schiff com outras macromoléculas.

A oxidação de etanol altera o potencial redox do hepatócito

A oxidação de etanol resulta em uma **razão aumentada entre o NADH e o NAD^+**. Isso inibe a oxidação do lactato a piruvato (um passo que requer NAD^+ como cofator). Cria-se um potencial para o desenvolvimento da acidose lática e, já que o piruvato é um substrato para gliconeogênese hepática, existe também um risco de hipoglicemia. O risco de hipoglicemia é ainda mais aumentado nos alcoólatras quando, por causa dá má nutrição, têm frequentemente baixos estoques de glicogênio hepático. Também, a mudança na proporção de NADH/NAD^+ inibe a β-oxidação de ácidos graxos e promove a síntese de triglicerídios: seu excesso é depositado no fígado e secretado no plasma como VLDL (Quadro Clínico p. 197). A esteatose hepática pode ser facilmente diagnosticada por ultrassonografia do fígado quando se vê um aumento uniforme da ecogenicidade (Fig. 30.8). Isto está associado à elevação dos níveis séricos de enzimas transaminases.

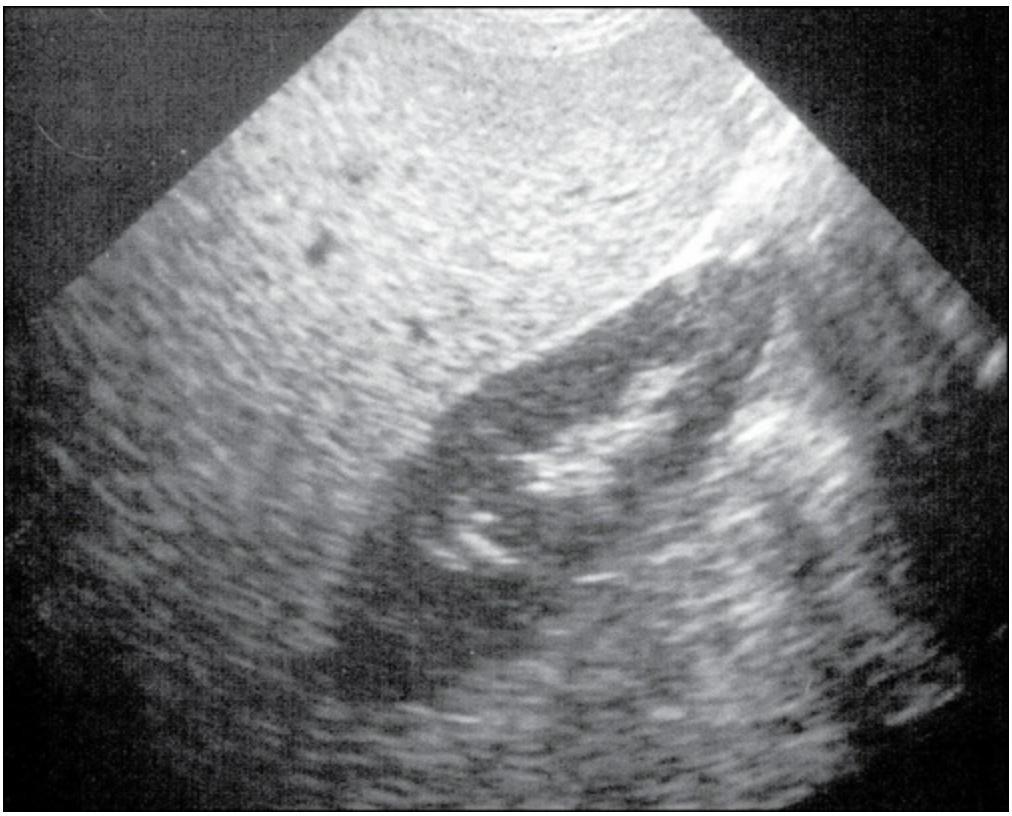


FIG. 30.8 Uma ultrassonografia de um fígado mostrando esteatose. (Cortesia do doutor A. Bannerjee, Birminghan Heartlands and Solihull NHS Trust, UK.)

O consumo de etanol também afeta o sistema ubiquitina de degradação proteica. O consumo crônico de álcool diminui a atividade do proteassoma. Isso pode desregular o sistema de sinalização hepático por inibição da via de sinalização do Cinase Janus-Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição (JAK-STAT), que está envolvida na resposta de fase aguda, defesa antiviral e reparação hepática (Cap. 40). A inibição da atividade do proteassoma pode também levar a apoptose aumentada (Cap. 43), uma característica da doença hepática alcoólica (ALD). A diminuição da atividade do

proteassoma, induzida pelo etanol, previne a degradação da CYP2E1, que está envolvida em reações de peroxidação; isso aumenta o estresse oxidativo e pode constituir outro fator contribuinte para a ALD.

Finalmente, o decréscimo da atividade do proteassoma, induzido pelo álcool, pode conduzir ao acúmulo de proteínas no fígado, o qual, por sua vez, causa o aumento do volume hepático (hepatomegalia; comum na ALD). Outros fenômenos induzidos pelo etanol incluem secreção aumentada de quimiocinas (incluindo a IL-8 e a proteína quimioatrativa de monócitos-1 [MCP-1; Cap. 18]) pelos hepatócitos, levando à infiltração do fígado por neutrófilos.

Sintomas de intolerância ao álcool são explorados para fortalecer a abstinência

A ADH e a ALDH são ambas sujeitas a polimorfismos genéticos, que têm sido investigados como uma base potencial herdada de suscetibilidade ao alcoolismo e à doença hepática alcoólica. A posse do alelo $ALDH2^2$, que codifica uma enzima com atividade catalítica reduzida, leva ao aumento das concentrações de acetaldeído plasmático após a ingestão de álcool. Isso causa no indivíduo uma experiência desagradável de rubor e sudorese, que desencoraja o alcoolismo. O disulfiram, um fármaco que inibe a ALDH, também causa esses sintomas quando o álcool é ingerido, e pode ser dado para fortalecer a abstinência ao álcool.



Quadro clínico

Uma mulher de 22 anos com overdose de acetaminofeno

Uma mulher de 22 anos foi admitida no hospital em estado de semiconsciência. Ela tinha sido encontrada com um bilhete suicida e com recipientes vazios de acetaminofeno. Os exames mostraram aspartato aminotransferase (AST) 5.500 U/L, fosfatase alcalina (ALP) 125 U/L, bilirrubina 70 µmol/L (4,1 mg/dl), tempo de protrombina 120 s (valor normal: 10-15 s), creatinina 350 µmol/L (4,0 mg/dL; taxa normal: 44-80 µmol/L, 0,50-0,90 mg/dL), glicose 2,6 mmol/L (47 mg/dl; taxa normal: 4,0-6,0 mmol/L, 72-109 mg/dL), e sangue com pH 7,1. (Intervalo de referência 7,35-7,45; isso equivale a 80 nmol/L H^+, sendo o intervalo de referência 35-45 nmol/L). Nenhum acetaminofeno foi encontrado no seu plasma.

Comentário

A paciente tinha falência hepática aguda, mais provavelmente causada pelo envenenamento por acetaminofeno. O acetaminofeno sanguíneo pode não ser detectável se o paciente recebe a primeira assistência médica 24 horas depois de uma *overdose*. O dano hepatocelular piora nas primeiras 72 horas, mas pode melhorar espontaneamente após esse tempo, como resultado da regeneração dos hepatócitos. Contudo, em pacientes com uma acidose metabólica (pH <7,35 ou H^+ acima de 45 nmol/L, após ressuscitação com fluidos), tempo de protrombina marcadamente elevado (>100 s) ou creatinina sérica >300 µmol/L (3,4 mg/dL), a mortalidade está na

ordem dos 90% e a transplantação hepática pode ser necessária. Para intervalos de referência (Cap. 40), ver a Tabela 30.2 e o Apêndice 1.

Tabela 30.2

Exames laboratoriais no diagnóstico diferencial de icterícia

Exame	Pré-hepática	Intra-hepática	Pós-hepática
Bilirrubina conjugada	Ausente	Aumentada	Aumentada
AST e ALT	Normal	Aumentada	Normal
ALP	Normal	Normal	Aumentada
Bilirrubina na urina	Ausente	Presente	Presente
Urobilinogênio na urina	Presente	Presente	Ausente

Intervalos de referência para testes de função hepática:

AST (aspartato aminotransferase), homens 15-40 U/L, mulheres 13-35 U/L; ALT (alanina aminotransferase), homens 10-40 U/L, mulheres 7-35 U/L; ALP (fosfatase alcalina), 50-140 U/L: a ALP se encontra fisiologicamente elevada em crianças e adolescentes; bilirrubina <21 µmol/L (<1,0 mg/dL); (γ-glutamil transpeptidase:) GGT, homens <90 U/L, mulheres <50 U/L.

Farmacogenômica

A resposta a muitos fármacos específicos será influenciada pelas propriedades cinéticas do fármaco (farmacocinética) e seus efeitos (farmacodinâmica)

Uma resposta individual ao fármaco pode ser influenciada pelos genes que codificam enzimas metabolizadoras de fármacos, receptores e transportadores. Muitas variabilidades nesses genes podem levar a diferenças interindividuais na resposta àquele fármaco.

A eficácia e a segurança da terapia medicamentosa, particularmente em pacientes idosos ou naqueles com doenças renais ou hepáticas, como comorbidades, e em pacientes cuja capacidade metabólica está reduzida, são atualmente o principal problema. Aproximadamente 3% das admissões hospitalares nos Estados Unidos estão relacionadas às interações fármaco-fármaco, e um estudo holandês relatou valores maiores do que 8,4%. Nos Estados Unidos, existem anualmente 2 milhões de casos de reações adversas a fármacos, incluindo 100.000 mortes. Combinado com o fato de que os fármacos são eficazes em apenas 25-60% dos pacientes aos quais são prescritos, torna-se absolutamente essencial a investigação da resposta individual às fármacos.

A farmacogenômica estuda os efeitos da heterogeneidade genética na eficácia medicamentosa

Uma vez que o fígado tem um papel central no metabolismo de fármacos, a farmacogenômica de algumas enzimas hepáticas que metabolizam fármacos, especificamente as oxidases citocromo P-450, é clinicamente muito relevante. A *CYP2D6* é

responsável pelo metabolismo de mais de 100 fármacos, e um polimorfismo dessa enzima é responsável pela variação estabelecida a longo prazo no metabolismo da debrisoquina, anteriormente mencionada. Os pacientes são classificados como metabolizadores de debrisoquina ultrarrápido, extenso, intermediário e fraco. Existe um lócus genético *CYP2D6*, e indivíduos podem ter dois, um ou nenhum alelo funcional correspondendo aos metabolizadores extenso, intermediário e baixo, respectivamente; a multiplicação do gene pode levar a três alelos funcionais e ao fenótipo de metabolizador ultrarrápido. Setenta e cinco variantes alélicas da *CYP2D6* têm sido identificadas, e técnicas farmacogenéticas podem identificar o fenótipo metabolizador, assim predizendo a resposta clínica ao tratamento. Embora a debrisoquina agora seja obsoleta, o polimorfismo da *CYP2D6* é relevante para muitos fármacos usados nas práticas cardíaca e psiquiátrica. Por exemplo, os metabolizadores fracos são provavelmente mais suscetíveis à intoxicação por fármacos do que outros indivíduos, e pouco capazes de se beneficiar do analgésico codeína, um pró-fármaco que é metabolizada pela *CYP2D6* a morfina, o fármaco ativo. Um polimorfismo da *CYP2C19* novamente leva a fenótipos de metabolizadores extenso e fraco, afeta o metabolismo dos fármacos inibidores da bomba de prótons, usados na doença do refluxo gastroesofágico, e a eficácia do tratamento (Cap. 8).

Testes bioquímicos de função hepática

Os laboratórios clínicos oferecem um painel de medições em amostras de plasma ou soro (Tabela 30.2). Este grupo de exames é geral e, incorretamente, descrito como exames de "função" hepática. Apesar de as atividades plasmáticas das enzimas hepáticas serem marcadores da função hepática, elas não refletem exatamente a função do fígado. A taxa de síntese da protrombina, avaliada através do tempo de protrombina (TP), é um melhor indicador da função sintética hepática.

Os exames frequentemente incluem as medições de:

- bilirrubina
- albumina
- aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT)
- fosfatase alcalina (ALP)
- γ-glutamil transferase (γGT).

Transaminases

A aspartato aminotransferase (AST) e a alanina aminotransaminase (ALT) estão envolvidas na interconversão do amino e cetoácidos, e são necessárias para o metabolismo das proteínas e carboidratos (Cap. 19). Ambas estão localizadas na mitocôndria; a ALT também é encontrada no citoplasma. A atividade sérica da ALT e da AST aumenta na doença hepática (ALT é a medida mais sensível).

Tempo de protrombina

Na doença hepática, as funções sintéticas dos hepatócitos são prováveis de serem afetadas, e então seria esperado que o paciente tivesse um tempo de protrombina prolongado e uma baixa concentração de albumina sérica.



Quadro clínico

Um homem aparentemente saudável de 45 anos com transaminases anormais

Um empresário de 45 anos fez um exame médico de rotina, no qual foi encontrada ligeira dilatação do fígado. Os exames mostraram bilirrubina 15 μmol/L (0,9 mg/dL), AST 434 U/L, ALT 198 U/L, ALP 300 U/L, γ-glutamil transpeptidase (γGT) 950 U/L, e albumina 40 g/L (4 g/dL). Ele parecia perfeitamente bem.

Comentário

O paciente tem doença hepática. Os exames bioquímicos mostram evidência de dano hepatocelular. Isso pode se dever a ingestão excessiva de álcool, caso no qual poderão existir também eritrócitos com volume aumentado (macrocitose) e uma concentração sérica de ácido úrico aumentada. Os pacientes poderão negar o abuso de álcool. No entanto, a **esteatose hepática não alcoólica** (NAFLD) é crescentemente reconhecida como uma causa de anormalidades isoladas nas concentrações séricas de transaminases. A NAFLD ocorre em 40% dos pacientes com a chamada síndrome metabólica, na qual o sobrepeso central devido ao acúmulo de gordura visceral leva à resistência à insulina, hipertensão, dislipidemia e esteatose hepática. A última poderá conduzir a cirrose, tal como a doença hepática induzida pelo álcool. Uma biopsia hepática pode ser necessária para o diagnóstico. Nesse paciente, o exame microscópico do tecido mostrou alterações características de esteatose alcoólica, hepatite e fibrose central. Este pode ser o precursor da cirrose, e o paciente deve se abster do álcool. Outras causas, tais como a infecção viral crônica do fígado ou uma hepatite crônica autoimune ativa, podem ser detectadas pelos exames de sangue. Para obter os valores de referência, consulte a Tabela 30.2.

Fosfatase alcalina

A ALP é sintetizada pelo trato biliar e pelo osso, e durante a gravidez pela placenta, mas esses tecidos contêm diferentes isoenzimas ALP. A origem da ALP pode ser determinada a partir do padrão da isoenzima. Alternativamente, a atividade plasmática de uma outra enzima, tal como γ-glutamil transpeptidase (GGP), que também se origina no trato biliar, pode ser medida e usada para confirmar a origem hepática de uma atividade sérica de ALP aumentada.

Classificação de distúrbios hepáticos

Doença hepatocelular

A doença inflamatória do fígado é denominada **hepatite** e pode ser de curta (aguda) ou longa (crônica) duração. Infecções virais, particularmente as hepatites A e E, são causas infecciosas de hepatite aguda, enquanto o álcool e o acetaminofeno são as causas toxicológicas mais comuns. A hepatite crônica, definida como uma inflamação que persiste por mais do que seis meses, pode também se dever aos vírus da hepatite B e C, álcool, e doenças imunológicas nas quais o corpo produz anticorpos contra os seus próprios tecidos (doenças autoimunes, Cap. 38). A **cirrose** é o resultado da hepatite crônica e é caracterizada microscopicamente pela fibrose dos lóbulos hepáticos. O termo **"falência hepática"** indica uma condição clínica em que a função bioquímica do fígado é grave e fatalmente comprometida.

Doença colestática

A colestase é o termo clínico para **obstrução biliar,** que pode ocorrer nos pequenos ductos biliares do próprio fígado ou nos ductos maiores extra-hepáticos. Os exames bioquímicos não podem distinguir entre estas duas possibilidades, que geralmente têm causas totalmente diferentes; técnicas de imagens, tais como a ultrassonografia, são mais úteis.

Icterícia

A icterícia pode ser pré, pós ou intra-hepática

A icterícia é clinicamente óbvia quando as concentrações de bilirrubina plasmática excedem 50 μmol/L (3 mg/dL). A hiperbilirrubinemia é o resultado de um desequilíbrio entre a sua produção e a sua excreção. As causas da icterícia (Tabela 30.3) são convencionalmente classificadas como:

Tabela 30.3
Causas da icterícia

Tipo	Causa	Exemplo clínico	Frequência
Pré-hepática	Hemólise	Autoimune	Incomum
		Hemoglobina anormal	Depende da região
Intra-hepática	Infecção	Hepatites A, B, C	Comum/muito comum
	Química/fármaco	Acetaminofeno	Comum
		Álcool	Comum
	Erros genéticos:	**Síndrome de Gilbert**	**1 em 20**
	bilirrubina	**Síndrome de Crigler-Najjar**	**Muito raro**
	metabolismo	**Síndrome de Dubin-Johnson**	**Muito raro**
		Síndrome de Rotor	**Muito raro**
	Erros genéticos:	Doença de Wilson	1 em 200.000
	síntese de proteínas específicas	α_1-antitripsina	1 em 1.000 com genótipo
	Autoimune	**Hepatite ativa crônica**	**Incomum/rara**
	Neonatal	Fisiológica	Muito comum
Pós-hepática	Obstrução dos ductos biliares intra-hepáticos	Fármacos	Comum
		Cirrose biliar primária	Incomum
		Colangite	Comum
	Obstrução dos ductos biliares extra-hepáticos	**Cálculos vesiculares**	**Muito comum**
		Tumor pancreático	**Incomum**
		Colangiocarcinoma	**Raro**

- **Pré-hepática:** aumento na produção ou insuficiência hepática na captação de bilirrubina (Fig. 30.9).

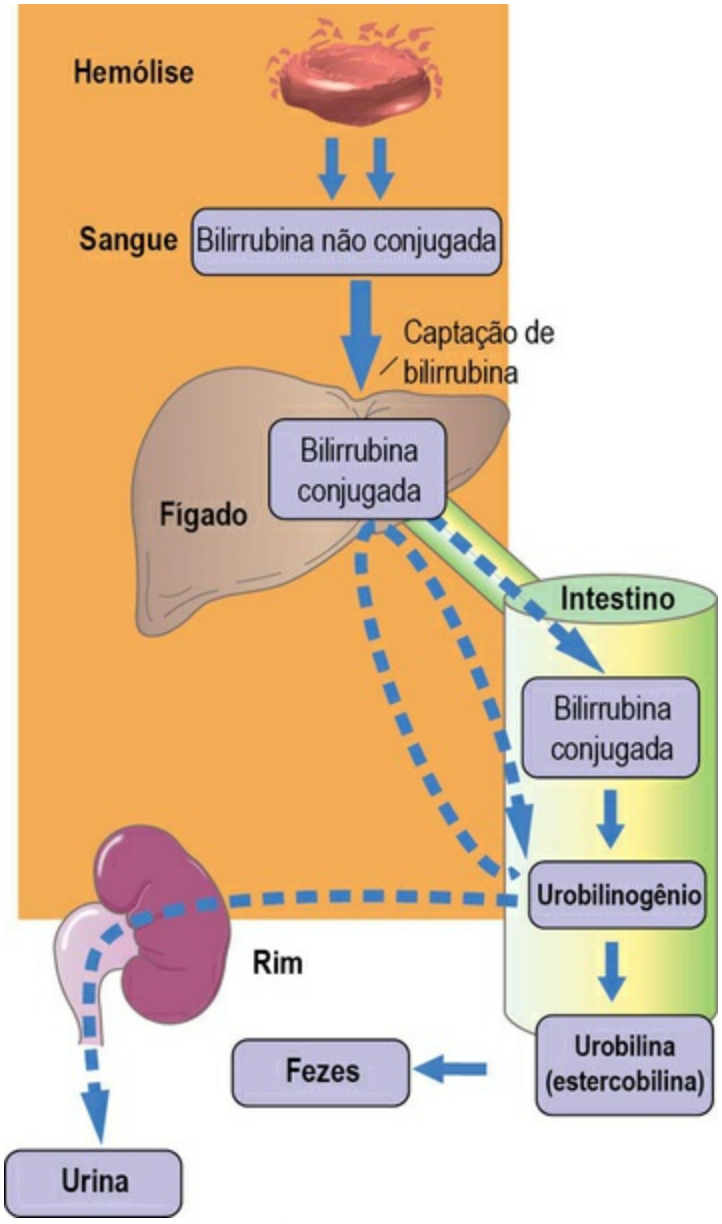


FIG. 30.9 Icterícia pré-hepática (hemolítica).
Existe um aumento na concentração de bilirrubina total plasmática pelo excesso de fração não conjugada (Tabela 30.2).

- **Intra-hepática:** metabolismo hepático insuficiente ou secreção de bilirrubina (Fig. 30.10).

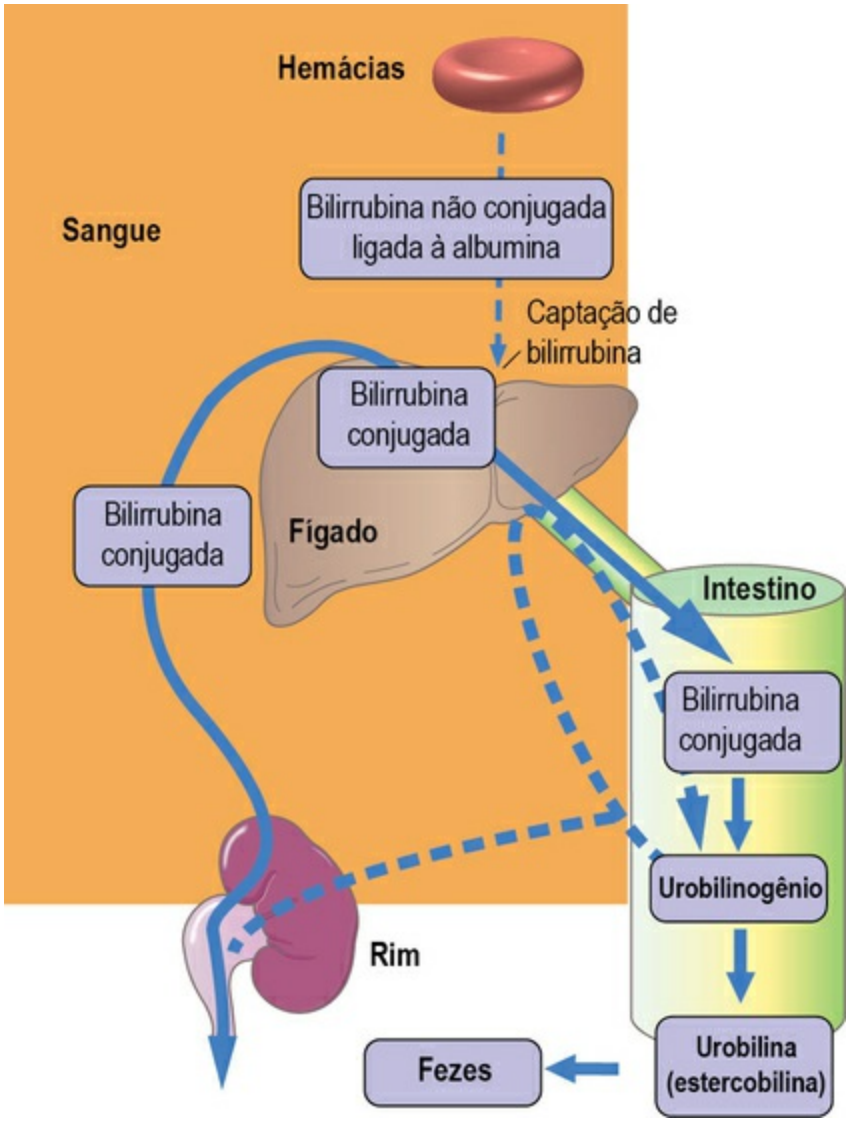


FIG. 30.10 Icterícia intra-hepática.
A bilirrubina no plasma está aumentada devido ao aumento na fração conjugada. O aumento das atividades enzimáticas no soro significa dano hepático (Tabela 30.2).

■ **Pós-hepática:** obstrução da excreção biliar (Fig. 30.11 e Quadro p. 210).

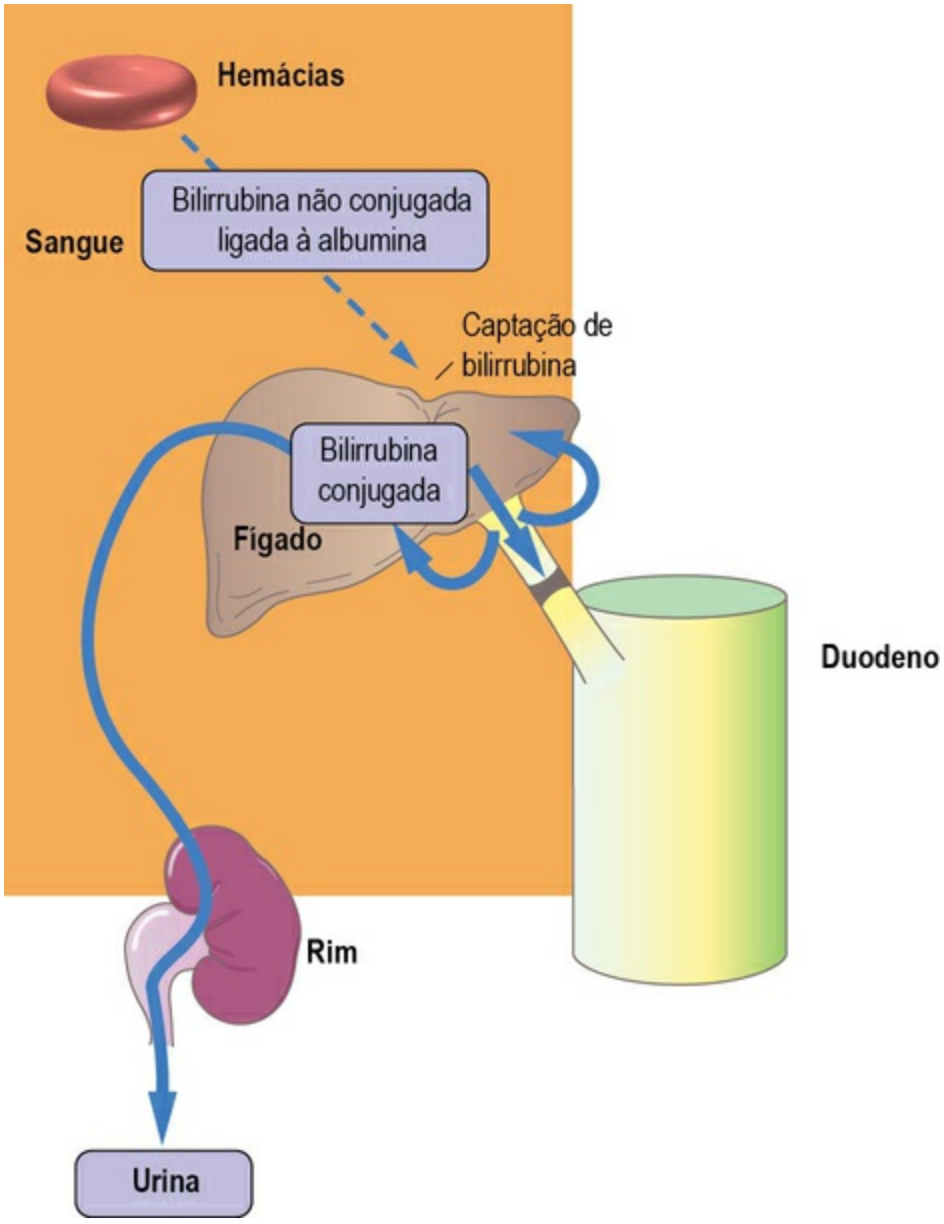


FIG. 30.11 Icterícia pós-hepática.
A bilirrubina plasmática está elevada devido ao aumento na fração conjugada. A obstrução do ducto biliar não permite a passagem de bile para o intestino. As fezes são caracteristicamente de cor pálida (Tabela 30.2). γGT, γ-glutamil transpeptidase; ALP, fosfatase alcalina.

A hiperbilirrubinemia pré-hepática resulta da produção excessiva de bilirrubina causada pela hemólise ou de uma anormalidade genética na captação hepática de bilirrubina não conjugada

A hemólise é frequentemente o resultado de doença imune, presença de hemácias estruturalmente anormais ou da degradação do sangue extravasado. A hemólise intravascular libera hemoglobina no plasma, onde ela é oxidada em meta-hemoglobina (Cap. 5) ou complexada com a haptoglobina. Mais frequentemente, hemácias são hemolisadas extravascularmente, dentro de fagócitos, e a hemoglobina é convertida em bilirrubina; essa bilirrubina **não é conjugada.** As bilirrubinas não conjugada e conjugada podem ser distinguidas no laboratório como bilirrubina indireta e direta.

A icterícia intra-hepática reflete uma disfunção generalizada dos hepatócitos

Nesta condição, a hiperbilirrubinemia é geralmente acompanhada por outras alterações nos marcadores bioquímicos da função hepatocelular.

Em recém-nascidos, a icterícia passageira é comum, particularmente em prematuros, e deve-se à imaturidade das enzimas envolvidas na conjugação da bilirrubina. A bilirrubina não conjugada é tóxica para o cérebro imaturo e causa uma condição conhecida como **kernicterus.** Se as concentrações de bilirrubina plasmática são julgadas muito altas, a fototerapia com luz azul-branca, a qual isomeriza a bilirrubina a muitos pigmentos solúveis que devem ser excretados com a bile, ou a transfusão sanguínea para remover o excesso de bilirrubina são necessárias para evitar o kernicterus.

A icterícia pós-hepática é causada pela obstrução da árvore biliar

Nesta condição a bilirrubina plasmática é conjugada, e outros metabólitos biliares, tais como os ácidos biliares, acumulam-se no plasma. Os aspectos clínicos são fezes pálidas, causadas pela ausência de bilirrubina e urobilina fecal, e urina escura como resultado da presença de bilirrubina conjugada hidrossolúvel. Na obstrução completa, o urobilinogênio e a urobilina estão ausentes da urina, já que não pode haver conversão intestinal da bilirrubina a urobilinogênio/urobilina, e por isso nenhuma excreção renal de urobilinogênio/urobilina, reabsorvida.



Quadro clínico

Um recém-nascido de 3 dias que desenvolveu icterícia: o significado da icterícia neonatal

Um bebê a termo normal desenvolveu icterícia no terceiro dia de vida com uma concentração de bilirrubina de 150 μmol/L (8,8 mg/dL), predominantemente da forma indireta. De resto, o bebê estava bem.

Comentário

Cerca de 50% dos bebês normais tornam-se ictéricos 48 horas após o nascimento. Essa icterícia fisiológica é causada pela ineficiência temporária na conjugação de bilirrubina, e se resolve nos primeiros 10 dias. A hiperbilirrubinemia é de natureza não conjugada; se grave, pode requerer fototerapia (luz ultravioleta para a fotoisomerização da bilirrubina em uma forma não tóxica) ou transfusão de sangue para impedir dano ao cérebro (kernicterus). Feridas de parto, infecção ou baixa ingesta de fluido podem aumentar a hiperbilirrubinemia. A icterícia nas primeiras 24 horas de vida é anormal e requer investigação para exclusão de hemólise, tal como a icterícia que se apresenta mais tarde ou persiste após 10 dias. Isso é sempre anormal e é provável indicar um erro congênito do metabolismo ou defeitos estruturais nos ductos biliares.

Quadro clínico

Um homem de 65 anos com icterícia e sem sintomas abdominais: o significado da icterícia adulta

Um homem de 65 anos foi admitido no hospital por causa de icterícia. Não existia dor abdominal, mas ele tinha notado a urina escura e as fezes pálidas. A vesícula biliar parecia palpável, mas não macia. Os exames de função hepática mostraram bilirrubina 230 μmol/L (13,5 mg/dL), AST 32 U/L e ALP 550 U/L. O teste de urina de vareta revelou a presença de bilirrubina, mas não de urobilina.

Comentário

O paciente tinha um histórico típico de icterícia obstrutiva. O aumento de ALP e as concentrações normais de AST foram compatíveis com isso, e a ausência de urobilina na urina indicou que o trato biliar estava obstruído. Foi importante realizar investigações do fígado por imagens para encontrar o local da obstrução; a ausência de dor sugeriu que cálculos na vesícula não eram a causa. A ultrassonografia mostrou dilatação do ducto biliar e a tomografia computadorizada mostrou uma massa na cabeça do pâncreas. Durante a cirurgia, o câncer no pâncreas foi confirmado. Para as faixas de referência, ver Tabela 30.2.

Genômica de doenças hepáticas

Várias doenças hepáticas surgem devido à disfunção de um único gene, e técnicas genéticas podem identificar aqueles com uma propensão para o desenvolvimento da doença ou confirmar o diagnóstico em indivíduos afetados.

A hemocromatose hereditária é um distúrbio do metabolismo do ferro geneticamente determinado

É comum no Norte da Europa, com uma prevalência populacional de 1 em 200 a 1 em 300. Os pacientes absorvem quantidades excessivas de ferro pelo intestino, e a quantidade excessiva de ferro tecidual leva à disfunção múltipla dos órgãos, incluindo cirrose hepática. Uma glicoproteína transmembrana, conhecida como HFE, modula a captação de ferro. Mutações no lócus genético que codifica esta proteína, o gene HFE, constituem a base para a hemocromatose hereditária. Dois pontos de mutações, *C282Y* e *H63D*, são encontrados na maioria daqueles com hemocromatose hereditária e podem ser identificados facilmente pelos métodos baseados em PCR.

A doença de Wilson é uma condição associada a dano hepático e no SNC e resulta da deficiência genética de ceruloplasmina

A ceruloplasmina é a principal proteína contendo cobre no fígado e no plasma e funciona como uma enzima oxidante do ferro (ferroxidase): a oxidação de Fe^{2+} a Fe^{3+} é necessária para a mobilização do ferro armazenado, e a deficiência nutricional em cobre produz

anemia. A doença de Wilson é uma condição associada a dano tanto para o fígado quanto para o SNC.

A cirrose, nesta condição, deve-se à deposição excessiva de cobre no fígado. A doença de Wilson também é causada por um defeito genético único, mas foram encontradas múltiplas mutações nos pacientes afetados; não existe um ensaio de rotina para o diagnóstico. O fígado também sintetiza proteínas responsáveis pelo armazenamento (ferritina) e transporte (transferrina) do ferro (Caps. 11 e 22).

A deficiência de α_1-antitripsina apresenta-se na infância como doença hepática, ou na vida adulta como doença pulmonar

A α_1-antitripsina é um membro da família de serpinas de inibidores de proteases de serina e, contrariamente ao seu nome, seu alvo predominante é a elastase derivada dos macrófagos. A deficiência genética de α_1-antitripsina se apresenta na infância como doença hepática, ou na vida adulta como doença pulmonar causada por destruição de tecido mediada pela elastase — doença pulmonar e cirrose hepática de início precoce.

Várias isoformas da α_1-antitripsina existem como resultado da variação alélica do gene AA1T: a isoforma normal é conhecida como M e as duas isoformas defeituosas comuns, como S e Z; o alelo nulo não produz α_1-antitripsina.

Mais de 90 variantes alélicas do gene AA1T, no chamado *lócus* inibidor de proteinases (Pi), foram descritas, a maioria das quais não afeta os níveis plasmáticos ou a atividade da AA1T. Variantes fenotípicas no AA1T foram inicialmente descritas pela sua mobilidade relativa em eletroforese, com a variante mais comum, a M, tendo mobilidade média. As variantes Z e S são mais frequentemente associadas a deficiência de AA1T, e são ambas resultado de mutações pontuais que podem também ser detectadas por ensaios de PCR.

O câncer hepático está particularmente associado a elevadas concentrações plasmáticas de α-fetoproteína

A α-fetoproteína (AFP) e a albumina têm uma considerável homologia de sequência, e parecem ter evoluído por reduplicação de um único gene ancestral. No feto, a AFP parece servir funções fisiológicas similares às desempenhadas, no adulto, pela albumina; além disso, no final do primeiro ano de vida, a AFP no plasma é inteiramente substituída pela albumina. Durante a regeneração e a proliferação hepáticas, a AFP é novamente sintetizada; assim, elevadas concentrações plasmáticas de AFP são observadas no câncer hepático.

Existem diversos distúrbios genéticos que comprometem a conjugação ou secreção da bilirrubina

A **síndrome de Gilbert** afeta até 5% da população e causa uma hiperbilirrubinemia não conjugada leve, que é inofensiva e assintomática. Esta é causada por um polimorfismo dinucleotídico no promotor TATA box (Fig. 34.1) do gene da bilirrubina UDP-glicuronil transferase, que compromete a captação hepática da bilirrubina não conjugada.

Outras doenças hereditárias do metabolismo da bilirrubina são raras. A **síndrome de Crigler-Najjar,** que é o resultado de uma ausência completa ou de uma marcada redução na conjugação da bilirrubina, causa hiperbilirrubinemia não conjugada severa, que se manifesta à nascença; quando a enzima está completamente ausente, a condição é fatal. As síndromes de **Dubin-Johnson** e de **Rotor** comprometem a secreção biliar da bilirrubina conjugada e, como tal, causam hiperbilirrubinemia conjugada, que é geralmente leve.

Resumo

- O fígado exerce um papel central no metabolismo humano.
- Ele está intensamente envolvido na síntese e no catabolismo de carboidrato, lipídios e proteínas.
- Ele sintetiza um leque de proteínas de fase aguda em resposta a inflamação e infecção, e medições laboratoriais dessas proteínas são clinicamente úteis no acompanhamento do progresso da doença.
- Ele está envolvido no metabolismo de bilirrubina derivada do catabolismo do heme.
- Os processos patológicos frequentemente levam o paciente a apresentar icterícia devido à hiperbilirrubinemia.
- O fígado tem um papel central na desintoxicação de fármacos.
- Sua função bioquímica é avaliada na prática clínica utilizando um painel de exames de sangue, chamados exames de função hepática, anormalidades estas que podem apontar para doenças que afetam os sistemas hepatocelular ou biliar.

Questões para aprendizagem

1. Discuta como a posição anatômica e a estrutura do fígado permitem absorver e metabolizar lipídio, proteína e carboidrato, assim como xenobióticos do intestino, antes da liberação destas moléculas ou de seus derivados na circulação sistêmica.
2. Descreva a função do fígado na síntese de proteína e a resposta sistêmica a inflamação.
3. Esboce como o fígado processa a bilirrubina, e descreva as causas bioquímicas da hiperbilirrubinemia (icterícia) e sua classificação.
4. Como o fígado metaboliza as fármacos?
5. Discuta os exames bioquímicos usados pelo laboratório clínico na investigação de doença hepática.

Leituras sugeridas

Bernal, W., Auzinger, G., Dhawan, A., et al. Acute liver failure. *Lancet*. 2010; 376:190–201.

Donohue, T. M., Cederbaum, A. I., French, S. W. Role of the proteasome in ethanol-induced liver pathology. *Alcohol Clin Exp Res*. 2007; 31:1446–1459.

Hall, P., Cash, J., What is the real function of the liver 'function' tests? *Ulster Med J*. 2012;81(1):30–36 www.ums.ac.uk/umj081/081(1)030.pdf

Puy, H., Gouya, L., Deybach, J.-C. Porphyrias. *Lancet*. 2010; 375:924–937.

Schuckit, M. A. Alcohol-use disorders. *Lancet*. 2009; 373:492–501.

Wijnen, P. A.H. M., Op den Buijsch, R. A.M., Drent, M., et al. Review article: the prevalence and clinical relevance of cytochrome P450 polymorphisms. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007; 26(suppl2):211–219.

Wilkinson, G. R. Drug metabolism and variability among patients in drug response. *N Engl J Med*. 2005; 352:2211–2221.

Sites

Liver diseases. MedlinePlus. www.nlm.nih.gov/medlineplus/liverdiseasesgeneral.html.

Liver disease. Lab Tests Online: www.labtestsonline.org/understanding/conditions/liver_disease.html.

Liver function tests. Lab Tests Online. www.labtestsonline.org.uk/understanding/analytes/liver-panel.

PharmGKB. The Pharmacogenomics Knowledgebase. www.pharmgkb.org/index.jsp.

CAPÍTULO 31

Biossíntese e Degradação de Nucleotídios

Alejandro Gugliucci and Robert Thornburg

Objetivos

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Comparar e contrastar a estrutura e a biossíntese de purinas e pirimidinas, destacando as diferenças entre as vias *de novo* e de recuperação.
- Descrever como as células suprem suas necessidades de nucleotídios nos vários estágios do ciclo celular.
- Explicar a lógica bioquímica para o uso de fluorouracil e metotrexato em quimioterapia.
- Descrever a base metabólica e o tratamento de doenças clássicas do metabolismo de nucleotídios: gota, síndrome de Lesch-Nyhan e SCIDS.

Introdução

Os nucleotídios, moléculas compostas de uma pentose, uma base nitrogenada e fosfato, são elementos-chave na fisiologia celular, uma vez que são:

- Precursores de ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA).
- Componentes de coenzimas, por exemplo, NAD(H), NADP(H), FMN(H2) e CoA.
- Unidades de energia, conduzindo muitos processos metabólicos, por exemplo, ATP e GTP.
- Carreadores nas biossínteses, por exemplo, UDP para carboidratos e CDP para lipídios.
- Moduladores de regulação alostérica do metabolismo.
- Mensageiros secundários, por exemplo, cAMP e cGMP.

Podemos sintetizar grandes quantidades de nucleotídios de purina e pirimidina intermediários metabólicos. Dessa forma, embora ingiramos ácidos nucleicos e nucleotídios na alimentação, a sobrevivência não requer sua absorção e utilização. Como os nucleotídios estão envolvidos em muitos níveis do metabolismo, eles são alvos

importantes para os agentes quimioterápicos usados no tratamento de infecções microbianas e parasitárias, e câncer.

Este capítulo descreverá a estrutura e o metabolismo de duas classes de nucleotídios: purínicos e pirimidínicos. As vias metabólicas são divididas em quatro seções:

- Síntese *de novo* de nucleotídios de metabólitos básicos, a qual é necessária em células em divisão.
- Vias de recuperação, que reciclam bases e nucleosídios pré-formados e fornecem um suprimento adequado de nucleotídios para células em repouso.
- Vias catabólicas para excreção de produtos de degradação de nucleotídios, um processo que é essencial para limitar o acúmulo de níveis tóxicos de nucleotídios no interior das células: a eliminação comprometida ou a produção aumentada de ácido úrico podem ocasionar gota.
- Vias biossintéticas de conversão de ribonucleotídios em desoxirribonucleotídios, fornecendo precursores do DNA.

Purinas e pirimidinas

Os nucleotídios são formados por três componentes: uma base nitrogenada, um açúcar de cinco carbonos e fosfato

As bases nitrogenadas encontradas nos ácidos nucleicos pertencem a um de dois grupos heterocíclicos, purinas ou pirimidinas (Fig. 31.1). As principais purinas, tanto de DNA quanto de RNA, são guanina e adenina. No DNA, as principais pirimidinas são timina e citosina, enquanto no RNA são uracila e citosina: a timina é exclusiva de DNA e a uracila é exclusiva de RNA.

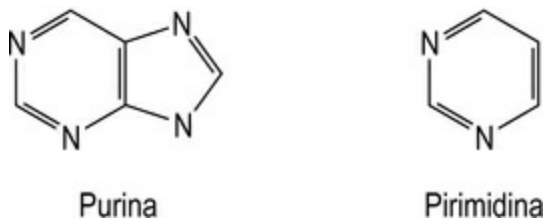
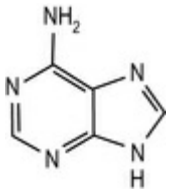
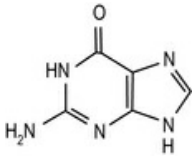
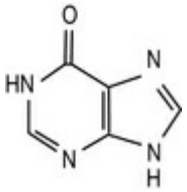
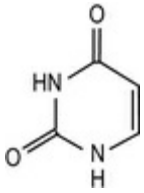
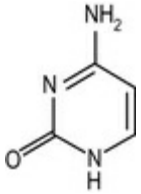
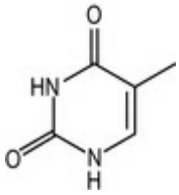


FIG. 31.1 Classificação de nucleotídios. Estruturas básicas de purinas e pirimidinas.

Quando as bases nitrogenadas estão combinadas com um açúcar de cinco átomos de carbono, elas são conhecidas como nucleosídios. Quando os nucleosídios são fosforilados, os compostos são conhecidos como nucleotídios. O fosfato pode estar ligado à posição 5′ ou à posição 3′ da ribose, ou ambas. A Tabela 31.1 dá os nomes e as estruturas das purinas e pirimidinas mais importantes.

Tabela 31.1

Nomes e estrutura de purinas e pirimidinas importantes

Estrutura	Base livre	Nucleosídio	Nucleotídio
	adenina	adenosina	AMP ADP ATP cAMP
	guanina	guanosina	GMP GDP GTP cGMP
	hipoxantina	inosina	IMP
	uracila	uridina	UMP UDP UTP
	citosina	citidina	CMP CDP CTP
	timina	timidina	TMP TDP TTP

A designação NTP se refere ao ribonucleotídio trifosfatado. O prefixo d, como em dATP, é usado para identificar desoxirribonucleotídios. dTTP é normalmente escrito como TTP, com o prefixo d implícito.

Metabolismo das purinas

Síntese *de novo* do anel purínico: síntese de monofosfato de inosina (IMP)

As purinas e as pirimidinas são sintetizadas tanto por vias *de novo* quanto por vias de reciclagem

A demanda de biossíntese de nucleotídios pode variar muito. Ela é alta durante a fase S do ciclo celular, quando as células estão por se dividir (Cap. 42). O processo é, portanto,

muito ativo nos tecidos em crescimento, nas células ativamente proliferativas, como células sanguíneas e células cancerosas, e quando os tecidos estão se regenerando. As biossínteses de purina e pirimidina são processos com alto custo energético, que estão sujeitos aos mecanismos intracelulares que detectam e regulam eficazmente as quantidades das misturas de intermediários e produtos.

As matérias-primas para a síntese de purina são: CO_2, aminoácidos não essenciais (Asp, Glu, Gly), e derivativos de ácido fólico que atuam como doadores de um único átomo de carbono. Cinco moléculas de ATP são necessárias para a síntese de IMP, o primeiro produto de purina e precursor comum de AMP e GMP. O material inicial para a síntese de IMP é a ribose 5-fosfato, um produto da via de pentose fosfato (Cap. 12). A primeira etapa, catalisada pela **ribose fosfato pirofosfocinase (ou PRPP sintetase)**, gera a forma ativada da pentose fosfato pela transferência de um grupo pirofosfato do ATP para formar 5-fosforribosil-pirofosfato (PRPP) (Fig. 31.2). Em uma série de dez reações, o PRPP é convertido em IMP. A maioria dos carbonos e todos os nitrogênios do anel de purina são de derivativos dos aminoácidos: um carbono é derivado de CO_2 e dois de ***N*^{10}-formil-tetra-hidrofolato (THF),** um derivado do ácido fólico. A deficiência de folato pode comprometer a síntese de purinas, o que pode resultar em doença ou pode ser explorada clinicamente para matar células que se dividem rapidamente, as quais têm uma alta demanda da biossíntese de purinas. O produto final desta sequência de reações é o ribonucleotídio IMP; o nucleosídio é inosina e a base purínica é chamada hipoxantina.

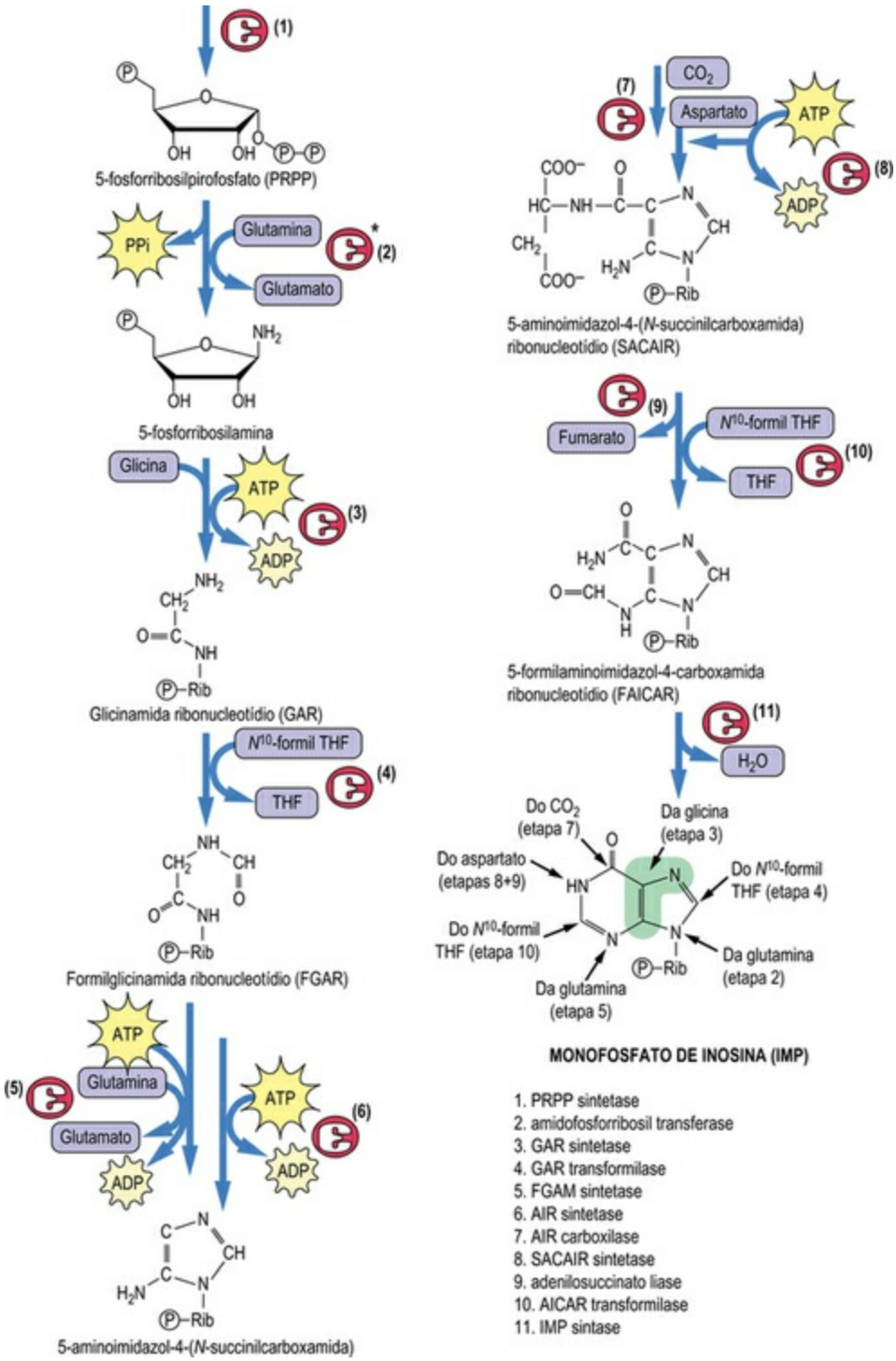


FIG. 31.2 Síntese de IMP. *O asterisco identifica a enzima reguladora amidofosforribosil transferase (2).

Síntese de ATP e GTP de IMP

O IMP não se acumula significativamente no interior da célula. Como mostrado na Figura 31.3, é convertido em AMP e GMP. Duas reações enzimáticas são necessárias em cada caso (Fig. 31.3). Enzimas diferentes, adenilato cinase e guanilato cinase, usam o ATP para sintetizar os nucleotídios difosfatados de nucleotídios monofosfatados. Finalmente, uma única enzima, denominada **nucleotídio difosfocinase,** converte difosfonucleotídios em nucleotídios trifosfatados. Essa enzima tem atividade em todos os nucleotídios

difosfatados, incluindo pirimidinas e purinas e tanto ribo como desoxirribonucleotídios para as sínteses de RNA e DNA, respectivamente.

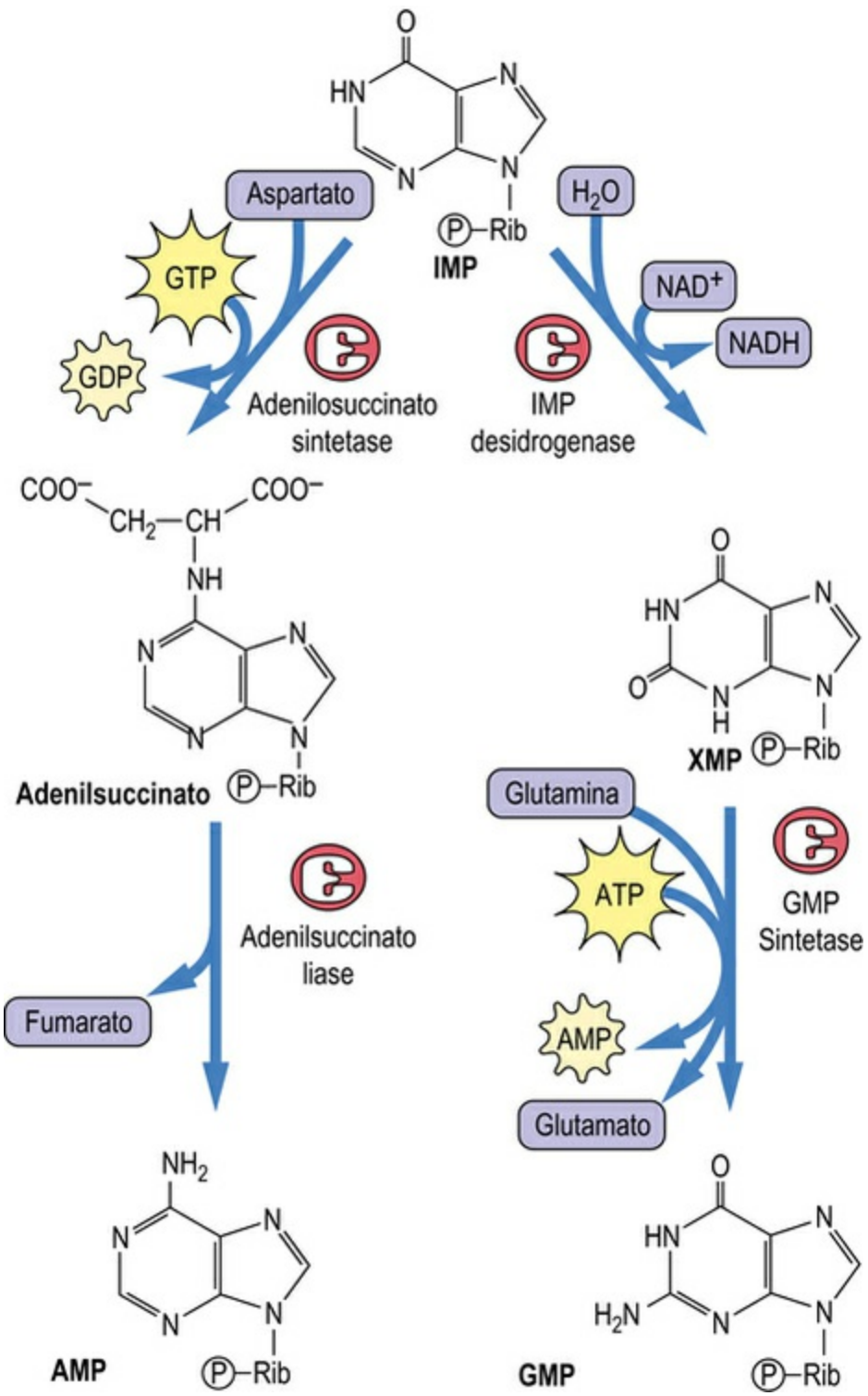


FIG. 31.3 Conversão de IMP em AMP e GMP. Duas reações enzimáticas são necessárias em cada ramificação da via. XMP, monofosfato de xantosina.

Vias de reciclagem para a biossíntese de nucleotídios de purina

Além da síntese *de novo*, as células podem usar nucleotídios pré-formados, obtidos da

dieta ou da quebra de ácidos nucleicos endógenos, por meio de vias de recuperação. Em mamíferos, existem duas enzimas na via de recuperação de purina. A **adenina fosforibosil transferase (APRT)** converte a adenina livre em AMP (Fig. 31.4A). A **hipoxantina-guanina fosforribosil transferase (HGPRT)** catalisa uma reação similar para hipoxantina (a base purínica no IMP) e guanina (Fig. 31.4B). Os nucleotídios purínicos são sintetizados preferencialmente por vias de recuperação, contanto que as bases livres estejam disponíveis. Esta preferência é mediada por inibição pela hipoxantina da amidofosforribosil transferase, etapa 2 da via *de novo*. Observe que essa etapa é o ponto de inibição da biossíntese de purina, uma vez que o PRPP é também usado em outros processos biossintéticos, incluindo vias de recuperação de nucleotídios.

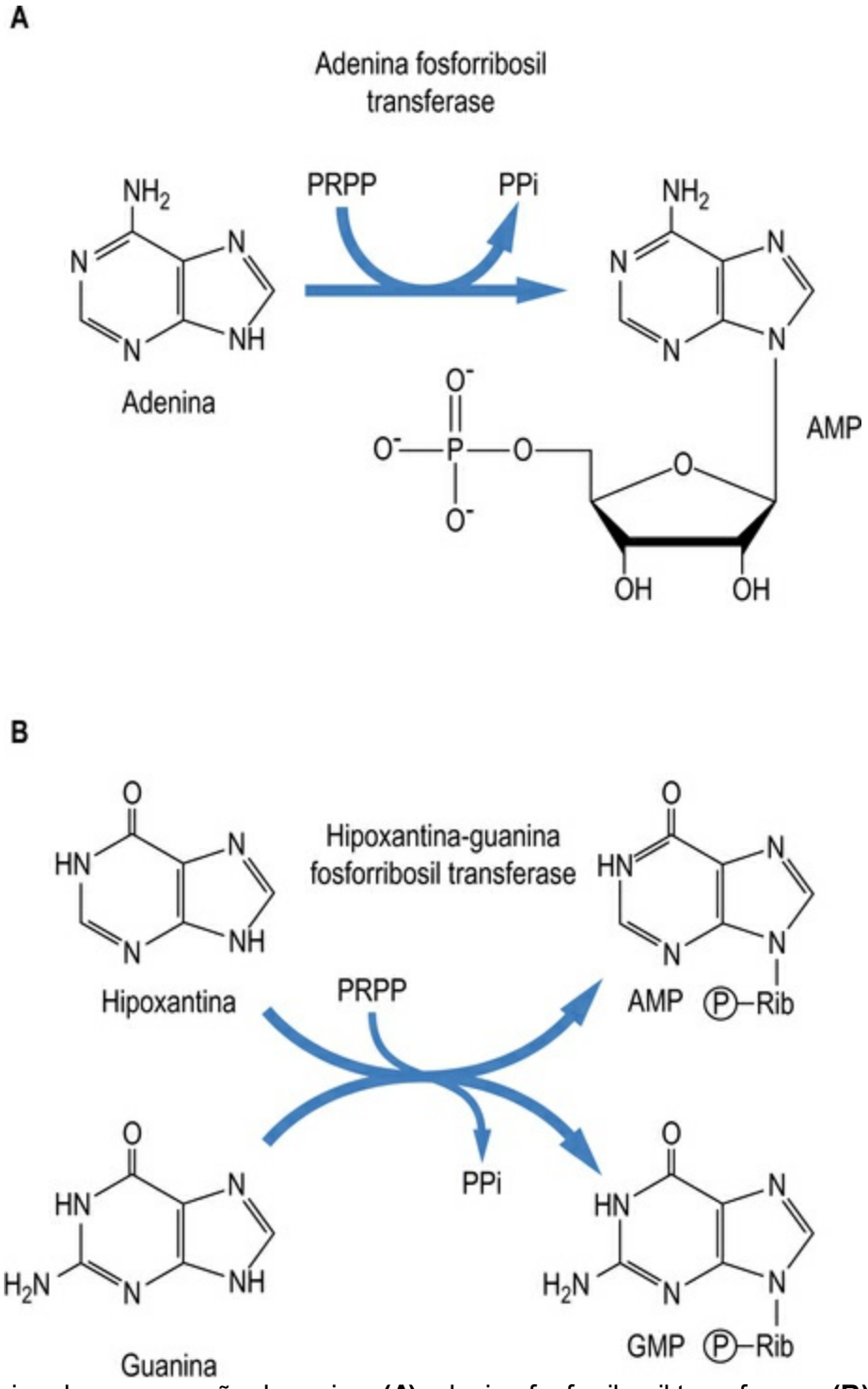


FIG. 31.4 As vias de recuperação de purina. **(A)** adenina fosforribosil transferase. **(B)** Hipoxantina-guanina fosforribosil transferase.

Purinas e metabolismo de ácido úrico em humanos

Fontes e eliminação de ácido úrico

O ácido úrico é o produto final do catabolismo de purinas em humanos

O ácido úrico, o produto final do catabolismo de purinas em humanos, não é metabolizado e deve ser excretado. Contudo, o processamento renal complexo do urato, descrito a seguir, sugere uma vantagem evolutiva para se ter altos níveis de urato circulante. Como observado no Capítulo 37, o ácido úrico é um antioxidante circulante.

Em pH 7,4, está 98% ionizado e, portanto, circula como urato monossódico. Este sal tem baixa solubilidade, o fluido extracelular se torna saturado em concentrações de urato um pouco acima do limite superior da faixa de referência normal. Portanto, existe uma tendência do urato monossódico a se cristalizar em indivíduos com **hiperuricemia.** A manifestação clínica mais óbvia deste processo é a gota, na qual se formam cristais nas cartilagens, membranas e líquidos sinoviais. Isto pode ser acompanhado por **cálculo renal** (pedras de urato) e **"tofos"** (acúmulo de urato de sódio em tecidos moles). Um aumento repentino da produção de urato, por exemplo, durante quimioterapia, quando muitas células morrem rapidamente, pode levar à cristalização dispersa de urato nas articulações, mas principalmente na urina, causando uma **nefropatia de urato** aguda.

Existem três fontes de purina no homem: síntese *de novo,* vias de recuperação e dieta. O conjunto total corporal de urato (portanto, a concentração plasmática de ácido úrico) é controlado pelas taxas relativas de formação e excreção de urato. Mais da metade do urato é eliminada pelos rins, e o restante pelos intestinos, onde bactérias se utilizam dele. Nos rins, o urato é filtrado e quase totalmente reabsorvido no túbulo proximal. Mais adiante, ocorrem secreção e absorção, de forma que a remoção global de urato totaliza cerca de 10% do total filtrado, isto é, 90% ficam retidos no organismo. Normalmente, a excreção de urato aumenta se a carga filtrada é aumentada. Devido à função do rim no metabolismo do urato, doenças renais podem levar à retenção de urato e precipitação de urato no rim (pedras) e urina. As purinas da dieta totalizam cerca de 20% do urato excretado. Portanto, a restrição de purinas na dieta (menos carne e vinho tinto) pode reduzir os níveis de urato a somente 10-20%.

Formação endógena de ácido úrico

Cada um dos monofosfatos de purina (IMP, GMP e AMP) pode ser convertido em seus nucleosídios correspondentes pela 5'-nucleotidase. A enzima purina nucleosídio fosforilase converte, então, os nucleosídios inosina ou guanosina nas bases purínicas livres hipoxantina e guanina e ribose-1-P. A hipoxantina é oxidada e a guanina é desaminada para gerar xantina (Fig. 31.5). Duas outras enzimas, **AMP desaminase** e **adenosina desaminase,** convertem o grupo amino do AMP e da adenosina em IMP e inosina, respectivamente, que são convertidos, então, em hipoxantina. Em resumo, a guanina é convertida diretamente em xantina, enquanto a inosina e a adenina são convertidas em hipoxantina e, então, em xantina.

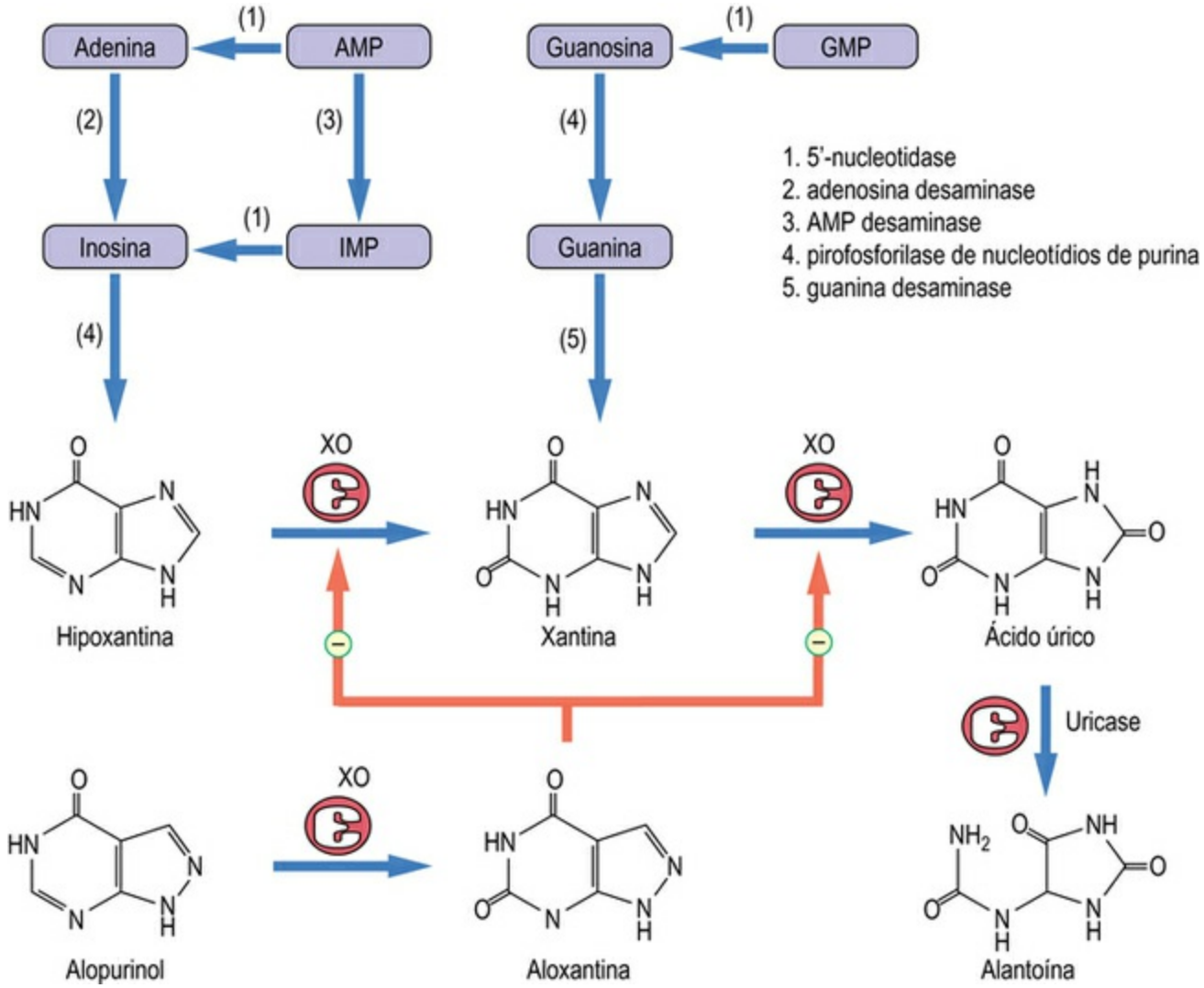


FIG. 31.5 Degradação de purinas e base bioquímica do tratamento de gota com alopurinol. A inibição da xantina oxidase (XO) por aloxantina é o mecanismo envolvido no tratamento de gota com alopurinol. A enzima uricase não existe em primatas (incluindo o homem), mas é comumente usada para a dosagem de níveis séricos de ácido úrico em seres humanos. (1) 5'-nucleotidase; (2) adenosina desaminase; (3) AMP desaminase; (4) pirofosforilase de nucleotídios de purina; (5) guanina desaminase.

A **xantina oxidase (XO),** a enzima final desta via, catalisa uma reação de oxidação em dois passos, convertendo a hipoxantina em xantina e, em seguida, a xantina em ácido úrico. O ácido úrico é o produto metabólico final do catabolismo de purina em primatas, pássaros, répteis e muitos insetos. Outros organismos, incluindo a maioria dos mamíferos, peixes, anfíbios e invertebrados, metabolizam ácido úrico a produtos mais solúveis, tais como alantoína (Fig. 31.5).

Hiperuricemia e gota

A maioria das pessoas com hiperuricemia permanece assintomática por toda a vida, mas não existe gota sem hiperuricemia

A concentração plasmática de urato é, em média, mais alta em homens do que em mulheres, tende a aumentar com a idade e é geralmente elevada em indivíduos obesos e em indivíduos de classes socioeconômicas mais altas. Níveis mais elevados de ácido úrico se correlacionam com maior consumo de açúcar. O risco de gota, uma doença dolorosa

resultante da precipitação de cristais de urato de sódio nas articulações e na derme, aumenta com maiores concentrações plasmáticas de urato (Quadro p. 414). Esta pode se dever à formação aumentada ou à excreção diminuída de ácido úrico, ou ambas. A excreção renal diminuída de urato pode resultar de uma redução na filtração e/ou secreção. Muitos fatores (incluindo drogas e álcool) também afetam o processamento tubular de uratos e podem causar ou aumentar a hiperuricemia.

Metabolismo das pirimidinas

Como ocorre com as purinas, as pirimidinas (uracil, citosina e timina) também são sintetizadas por meio de uma série complexa de reações usando matéria-prima comum disponível nas células. Uma importante diferença é que a base de pirimidina é produzida primeiramente e o açúcar é adicionado depois (Fig. 31.6), enquanto as purinas são construídas em um esqueleto de ribose-5-P (Fig. 31.2). O monofosfato de uridina (UMP) é o precursor de todos os nucleotídios pirimidínicos. A via *de novo* produz UMP, que é, então, convertido em trifosfato de citidina (CTP) e trifosfato de timidina (TTP). As vias de recuperação também usam pirimidinas pré-formadas.

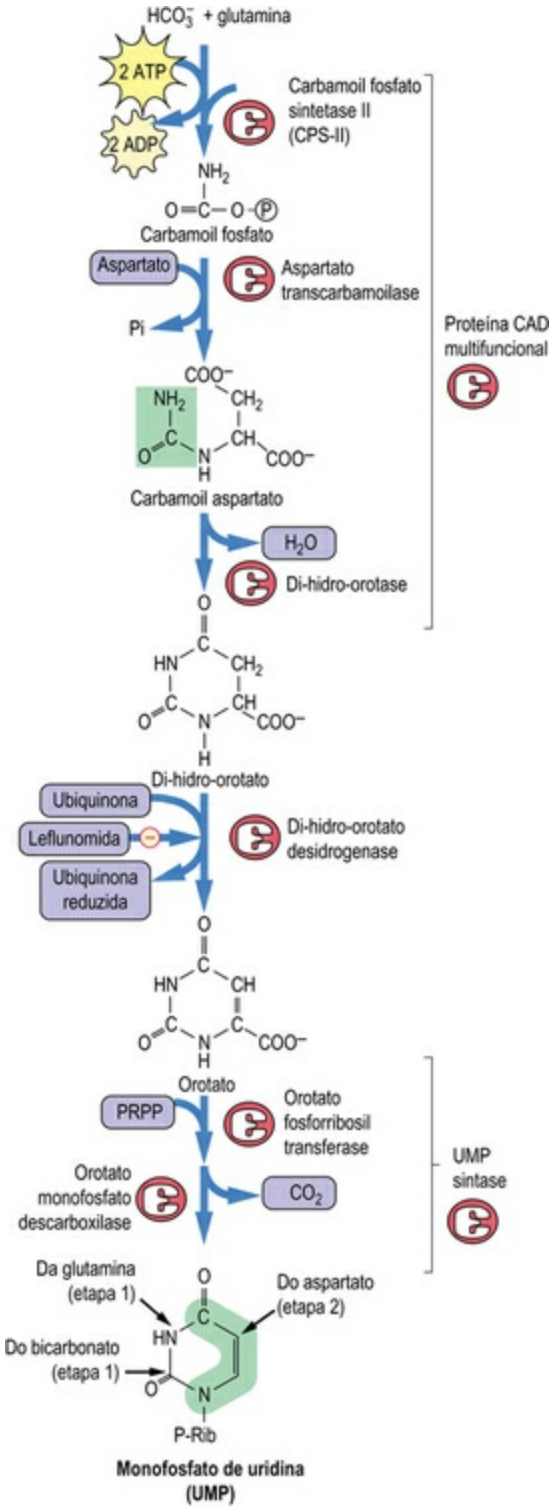


FIG. 31.6 A via metabólica de síntese de pirimidinas. Formação de ácido orótico e UMP, o primeiro nucleotídio pirimidínico.

Via *de novo*

As biossínteses de pirimidina e purina compartilham vários precursores comuns: CO_2, aminoácidos (Asp, Gln) e, para timina, ***N*⁵,*N*¹⁰-metileno-THF.** A via de biossíntese de UMP está esquematizada na Figura 31.6. A primeira etapa, catalisada pela enzima **carbamoil fosfato sintetase II (CPS II),** usa bicarbonato, glutamina e 2 moles de ATP para formar carbamoil fosfato (a CPS I é usada na síntese de arginina no ciclo da ureia; Cap. 19). A maioria dos átomos necessários para a formação do anel de pirimidina é

derivada de aspartato, adicionados em uma única etapa pela aspartato transcarbamoilase (ATCase). O carbamoil aspartato é, então, ciclizado em ácido di-hidro-orótico pela ação da enzima di-hidro-orotase. O ácido di-hidro-orótico é oxidado em ácido orótico por uma enzima mitocondrial, di-hidro-orotato desidrogenase. A **leflunomida,** um inibidor específico desta enzima, é usada para o tratamento de artrite reumatoide porque o bloqueio desta etapa inibe a ativação do linfócito e, portanto, limita a inflamação. O grupo ribosil-5′-fosfato do PRPP é, então, transferido para o ácido orótico para formar o monofosfato de orotidina (OMP). Finalmente o OMP é descarboxilado para formar UMP. O UTP é sintetizado em duas etapas de fosforilação enzimática pela ação de UMP cinase e nucleotídio difosfocinase. A CTP sintetase converte UTP em CTP pela aminação de UTP (Fig. 31.7). Isto completa a síntese de ribonucleotídios para a síntese de RNA.

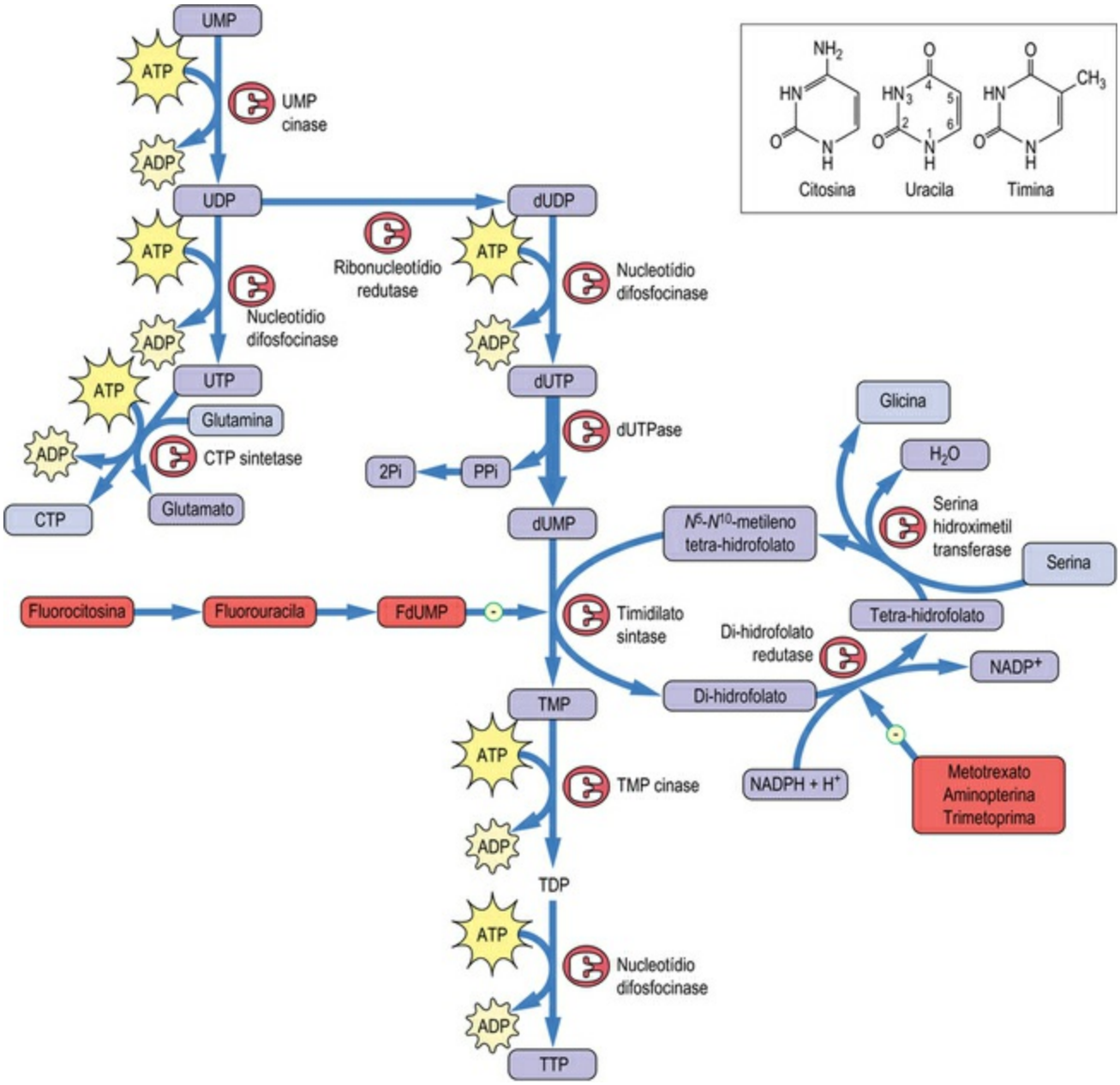


FIG. 31.7 Síntese de trifosfatos de pirimidina. A síntese de timidina é inibida por fluorodesoxiuridilato (FdUMP), metotrexato, aminopterina e trimetoprima nos pontos indicados.

A canalização metabólica por multienzimas aumenta a eficiência

Em bactérias, as seis enzimas da biossíntese de pirimidina (UMP) existem como proteínas distintas. Entretanto, durante a evolução dos mamíferos, as três primeiras atividades enzimáticas foram fusionadas em **CAD,** um polipeptídio multifuncional único codificado por um único gene. O nome da enzima deriva de suas três atividades: **Carbamoil fosfato sintetase, Aspartato transcarbamoilase e Di-hidro-orotase.** As duas atividades enzimáticas finais da biossíntese de pirimidina, orotato fosforribosil transferase e orotidilato descarboxilase, são também fusionadas em uma única enzima, UMP sintase. Como ocorre com o complexo de ácido graxo sintase (Cap. 16), esta fusão de atividades enzimáticas sequenciais evita a difusão de intermediários metabólicos no meio intracelular, aumentando, portanto, a eficiência metabólica das etapas individuais.



Quadro de conceitos avançados

As vias de recuperação são as principais fontes de nucleotídios nos linfócitos

Em humanos, linfócitos T em repouso, células do sistema imune produzidas no timo (Cap. 38), obtêm suas necessidades metabólicas de rotina de nucleotídios por meio da via de recuperação, mas a síntese *de novo* é necessária para garantir o crescimento de células que se dividem rapidamente. A recuperação de nucleotídios é especialmente importante nos linfócitos T infectados por HIV. Em pacientes assintomáticos, os linfócitos em repouso exibem um bloqueio da biossíntese *de novo* de pirimidina e quantidades de produtos de pirimidina correspondentemente reduzidas. Após a ativação da população dos linfócitos T, estas células não podem sintetizar DNA novo suficiente. O processo de ativação leva à morte celular, contribuindo para o declínio da população de linfócitos T durante os estágios tardios da infecção por HIV.

As vias de recuperação também são especialmente importantes para muitos parasitas. Estes organismos dependem metabolicamente de seus hospedeiros, usando metabólitos pré-formados, incluindo nucleotídios. Alguns parasitas, tais como *Mycoplasma, Borrelia* e *Chlamydia,* perderam os genes necessários para a síntese *de novo* de nucleotídios e obtêm estes componentes importantes do hospedeiro.

Vias de recuperação de pirimidina

Como ocorre para as purinas, as bases livres de pirimidina, disponíveis com a dieta ou com a degradação de ácidos nucleicos, podem ser recuperadas por várias enzimas de recuperação. A uracil fosforribosil transferase (UPRTase) é similar às enzimas das vias de recuperação de purina. Esta também ativa alguns agentes quimioterápicos, tais como 5-fluorouracil (FU) ou 5-fluorocitosina (FC). Uma uridina-citidina cinase e uma timidina cinase mais específica catalisam a fosforilação desses nucleosídios; nucleotídios cinases e difosfocinase completam o processo de recuperação.

Formação de desoxinucleotídios

A ribonucleotídio redutase

A ribonucleotídio redutase catalisa a redução da ribose a desoxirribose em nucleotídios para a síntese de DNA

Como o DNA tem desoxirribonucleotídios em lugar dos ribonucleotídios encontrados no RNA, as células necessitam de vias para converter ribonucleotídios em formas desoxi. Os desoxirribonucleotídios de adenina, guanina e uracil são sintetizados de seus correspondentes ribonucleotídio difosfatados por redução direta da 2′-hidroxila pela enzima ribonucleotídio redutase, como mostrado para dUDP na Figura 31.7. A redução da 2′-hidroxila da ribose usa um par de grupos sulfidrilas ligados à proteína (resíduos de cisteína). O grupo hidroxila é liberado como água, e as cisteínas são oxidadas em cistina durante a reação. Para regenerar uma enzima ativa, o dissulfeto deve ser reduzido de volta ao par de sulfidrilas original por troca de dissulfeto; isto é realizado pela reação com uma proteína pequena, **tiorredoxina.** A tiorredoxina, uma proteína Fe-S altamente conservada, é, por sua vez, reduzida pela flavoproteína tiorredoxina redutase.



Quadro clínico

A gota é resultante do excesso de ácido úrico

Diagnóstico

O diagnóstico de gota é principalmente clínico e baseado na demonstração de hiperuricemia. Cerca de 90% dos pacientes parecem excretar urato a uma taxa inadequadamente baixa para a concentração plasmática, enquanto cerca de 10% apresentam produção excessiva. A artrite gotosa tem um início tipicamente hiperagudo (menos de 24 horas), com dor aguda, inchaço, vermelhidão e calor na(s) articulação(ões), especialmente no dedão do pé. É confirmada pela presença de "tofos" ou cristais de urato de sódio no líquido sinovial. Os cristais, em forma de agulha, são vistos no interior dos neutrófilos e têm birrefringência negativa quando vistos sob luz polarizada.

Patogênese

Os cristais de urato nas articulações são fagocitados pelos neutrófilos (leucócitos do sangue e dos tecidos). Os cristais danificam as membranas lisossomais e celulares, causando lise e morte celular. A liberação das enzimas lisossomais nas articulações desencadeia uma reação inflamatória aguda. Várias citocinas aumentam e perpetuam a inflamação, e células fagocíticas, monócitos e macrófagos, agravam a inflamação.

Tratamento

A crise aguda é tratada com agentes anti-inflamatórios, incluindo fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (NSAIDS). Mudanças na dieta (menos carne, aumento da ingestão de água, redução de peso) e mudanças nas terapias concomitantes com

fármacos, tais como diuréticos, podem ser úteis. A probenecida, um fármaco uricosúrico, é comumente empregada para reduzir a uricemia. A colchicina, um desagregador de microtúbulos, pode também ser usada durante uma crise aguda para inibir a fagocitose e a inflamação. Se o paciente já é um hiperexcretor, "tofos" ou doença renal estão presentes, o alopurinol é, então, utilizado. Este é um inibidor de xantina oxidase (Fig. 31.5). O alopurinol sofre a primeira oxidação originando aloxantina, que não pode sofrer uma segunda oxidação. A aloxantina permanece ligada à enzima, atuando como um inibidor competitivo potente. Isso leva à formação reduzida de ácido úrico e ao acúmulo de xantina e hipoxantina, que são mais solúveis e excretadas na urina.



Quadro clínico

Síndrome de lesch–nyhan – deficiência de hgprt

O gene que codifica HGPRT está localizado no cromossomo X. Sua deficiência resulta em uma doença rara, recessiva, ligada ao X, a síndrome de Lesch-Nyhan. A ausência de HGPRT funcional causa um acúmulo excessivo de PRPP, que é também substrato para a enzima amidofosforribosil transferase. Isso estimula a biossíntese de purina em até 200 vezes. Por causa da síntese aumentada de purina, o produto de degradação, o ácido úrico, também se acumula em altos níveis. O ácido úrico elevado leva à artrite gotosa deformante e neuropatologia grave, resultando em retardo mental, espasmos, comportamento agressivo e compulsão à automutilação resultante de mordidas e arranhões.

Uma via única para TTP

A timina é sintetizada por uma via de reações complexas, oferecendo muitas oportunidades para a quimioterapia

O nucleotídio desoxi-TMP, abreviado como TMP, único para o DNA, é sintetizado por uma via especial envolvendo metilação da forma desoxirribose do uridilato, dUMP (Fig. 31.7). A via biossintética de TMP leva o UMP a UDP, então, através da ribonucleotídio redutase, a dUDP. O dUDP é, então, fosforilado a dUTP, o que cria um problema bioquímico inesperado. A DNA polimerase não discrimina eficientemente entre os dois desoxirribonucleotídios, dUTP e TTP — a única diferença é um grupo metil no *C*-5. Ela incorpora dUTP no DNA *in vitro;* esta reação levaria a altas taxas de mutagênese *in vivo*. Portanto, as células limitam a concentração de dUTP por hidrolisar rapidamente dUTP em dUMP com a enzima dUTPase. Essa enzima cliva uma ligação de alta energia e libera pirofosfato, que é rapidamente hidrolizado em fosfato, deslocando o equilíbrio sempre em direção à formação de dUMP. O dUMP é convertido em TMP pela **timidilato sintase (TS),** usando o N^5,N^{10}-metileno-THF como doador de grupos metila; o

produto di-hidrofolato é reciclado pela ação das enzimas, **di-hidrofolato redutase** e serina hidroximetil transferase. Duas etapas de fosforilação de TMP originam o TTP para a síntese de DNA.

A síntese de TTP é uma via improdutiva, mas oferece oportunidade de quimioterapia pela inibição da biossíntese de TMP (Fig. 31.7). Existe uma reação na síntese de pirimidina que requer um derivativo de THF: conversão de dUMP em TMP, catalisada pela timidilato sintase. Essa reação tem frequentemente uma velocidade limitante para a divisão celular. De fato, a deficiência de folato compromete a replicação celular, especialmente a replicação de células que se dividem rapidamente. Portanto, a deficiência de folato é uma causa frequente de anemia: as células da medula óssea envolvidas na eritropoese e hematopoese estão entre as células que se dividem mais rapidamente no corpo. Como descrito no Quadro de Conceitos Avançados da próxima página, a inibição de timidilato sintase, diretamente ou pela inibição da reciclagem de THF, oferece a oportunidade especial de quimioterapia direcionada para a síntese de precursores de DNA em células cancerosas que se dividem rapidamente.

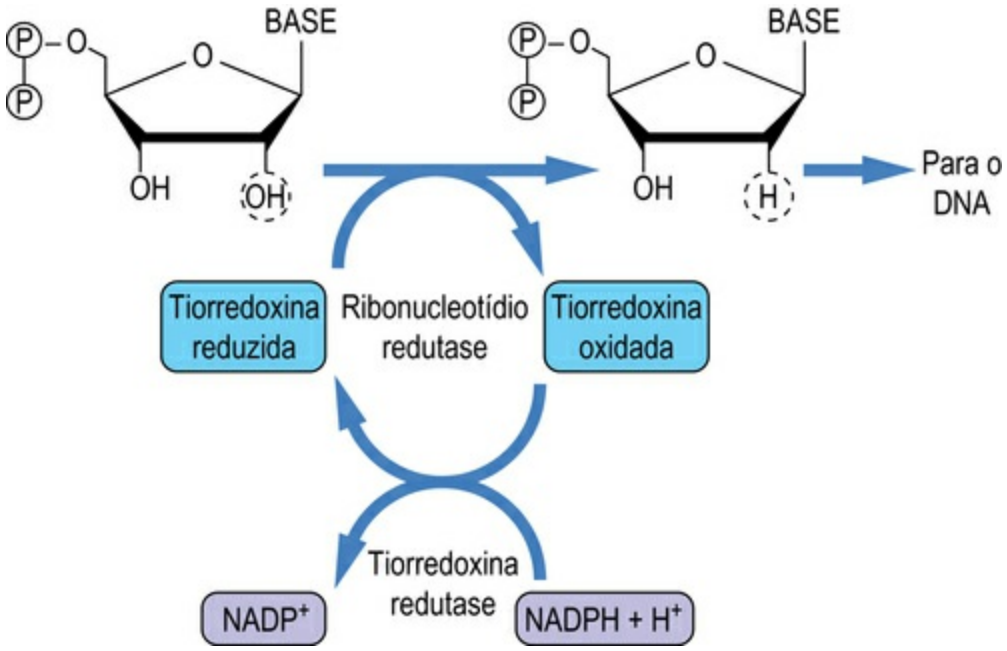


FIG. 31.8 Formação de desoxirribonucleotídios, exceto TTP, por ribonucleotídio redutase. Tiorredoxina e NADPH (da via de pentose fosfato) são necessários para a reciclagem da enzima.

O metabolismo *de novo* de nucleotídios é altamente regulado

A ribonucleotídio redutase é a enzima alostérica que coordena um fornecimento equilibrado de desoxirribonucleotídios para a síntese de DNA

Como os nucleotídios são necessários para a proliferação das células de mamíferos, as enzimas envolvidas na síntese *de novo* de ambas, purinas e pirimidinas, são induzidas durante a fase S da divisão celular. Regulações covalentes e alostéricas também

desempenham um papel importante no controle da síntese de nucleotídios. A proteína multimérica CAD é ativada por fosforilação por proteína cinase em resposta a fatores de crescimento, aumentando sua afinidade por PRPP e diminuindo a inibição por UTP. Ambas as mudanças favorecem a biossíntese de pirimidinas para a divisão celular.

Mol por mol, a biossíntese de pirimidina se compara à biossíntese de purina, sugerindo a presença de um controle coordenado. Entre elas, um dos pontos-chave é a reação da PRPP sintase. O PRPP é um precursor para todos os ribo e desoxirribonucleotídios. A PRPP sintase é inibida tanto por nucleotídios pirimidínicos como purínicos.

A ribonucleotídio redutase coordena a biossíntese de todos os quatro desoxirribonucleotídios

Como uma única enzima é responsável pela conversão de todos os ribonucleotídios em desoxirribonucleotídios, esta enzima está sujeita a uma rede complexa de regulação por retroalimentação. A ribonucleotídio redutase contém vários sítios alostéricos para a regulação metabólica. Os níveis de cada um dos dNTPs modulam a atividade da enzima frente a outros NDPs. Por regular a atividade enzimática da síntese de desoxirribonucleotídios em função da concentração dos diferentes dNTPs, frequentemente descrita como "conversa" entre as vias, a célula garante que razões adequadas dos diferentes desoxirribonucleotídios sejam produzidas para o crescimento normal e a divisão celular.



Quadro de conceitos avançados

Alvos quimioterapêuticos: reciclagem de folato e timidilato sintase

O fluorodesoxiuridilato (FdUMP) é um **inibidor suicida** específico de timidilato sintase. No FdUMP, um fluoreto altamente eletronegativo substitui o próton do carbono-5 da uridina. Este composto pode iniciar a conversão enzimática em dTMP por formar o complexo covalente enzima-FdUMP; contudo, o intermediário covalente não pode aceitar o grupo metil doado pelo metileno THF, nem pode ser quebrado para liberar a enzima ativa. O resultado é um complexo suicida, no qual o substrato fica covalentemente ligado no sítio ativo da timidilato sintase. O fármaco é frequentemente administrado como **fluorouracila,** e o metabolismo normal do corpo converte a fluorouridina em FdUMP. A fluorouracila é usada contra cânceres de mama, colorretal, gástrico e uterino.

A fluorocitosina é um agente antimicrobiano potente. Seu mecanismo de ação é similar ao do FdUMP; entretanto, ela deve ser inicialmente convertida em fluorouracila pela ação da **citosina desaminase.** A fluorouracila é subsequentemente convertida em FdUMP, que bloqueia a timidilato sintase, como descrito. Enquanto a citosina desaminase está presente na maioria dos fungos e bactérias, está ausente em animais e plantas. Portanto, em humanos, a fluorocitosina não é convertida em fluorouracila e

não é tóxica, enquanto nos micróbios, o metabolismo da fluorocitosina resulta em morte celular.

A **aminopterina** e o **metotrexato** são análogos do ácido fólico que se ligam cerca de 1.000 vezes mais fortemente à di-hidrofolato redutase (DHFR) do que o di-hidrofolato. Dessa forma, eles bloqueiam competitiva e quase irreversivelmente a síntese de dTMP. Esses compostos são também inibidores competitivos de outras reações enzimáticas dependentes de THF usadas na biossíntese de purinas, histidina e metionina. A trimetoprima se liga à DHFR, e se liga mais fortemente a DHFRs bacterianas do que às enzimas de mamíferos, o que a torna um agente antibacteriano eficaz. Os análogos de folato são agentes quimioterápicos relativamente não específicos. Eles envenenam as células que se dividem, não apenas as células cancerosas, mas também folículos capilares e células epiteliais do intestino, causando perda de cabelo e efeitos colaterais gastrintestinais da quimioterapia.

Catabolismo de nucleotídios pirimidínicos

Ao contrário da degradação de purinas a ácido úrico, as pirimidinas são degradadas em compostos solúveis, que são rapidamente eliminados na urina e não são fonte frequente de patologia. As acidúrias oróticas podem ocorrer nos casos raros em que as enzimas das vias catabólicas das pirimidinas se encontram deficitárias. Os nucleotídios e nucleosídios de pirimidina são convertidos em bases livres e o anel heterocíclico é clivado, originando **β-aminoisobutirato,** como produto principal de excreção, mais alguma amônia e CO_2.



Quadro clínico

As síndromes de imunodeficiências combinadas graves (SCIDS) são causadas por comprometimento das vias de recuperação de purinas

SCIDS são um grupo de desordens fatais resultantes de defeitos em ambas as funções celular e imune humoral. Os pacientes com SCIDS não podem produzir eficientemente anticorpos em resposta a um desafio antigênico. Quase 50% dos pacientes com a forma autossômica recessiva de SCIDS têm uma deficiência genética na enzima de recuperação de purina, **adenosina desaminase.** A fisiopatologia envolve linfócitos de ambas as origens do timo e da medula óssea (linfócitos T e B), como também "autodestruição" de células diferenciadas após estímulo antigênico. A causa precisa de morte celular não é bem conhecida, mas pode envolver acúmulo nos tecidos linfoides de adenosina, desoxiadenosina e dATP, acompanhado por depleção de ATP. O dATP inibe a ribonucleotídio redutase e, portanto, impede a síntese de nucleotídios de DNA. A descoberta de que a deficiência da próxima enzima na via de recuperação de purinas, nucleosídio fosforilase, está também associada a desordens de deficiência imunológica sugere que a integridade da via de recuperação de purinas é crítica para a diferenciação normal e função de células imunocompetentes no homem.

Quadro de conceitos avançados

O yin-yang da xantina oxidase — além da produção de ácido úrico

A xantina oxidase (XO) é uma flavoproteína citosólica ubíqua que controla o passo limitante do catabolismo das purinas. A oxidação de xantina a ácido úrico produz $FADH_2$, e a reoxidação do $FADH_2$ produz espécies reativas de oxigênio (ROS; superóxido e peróxido de hidrogênio), que são tóxicas quando em elevadas concentrações na célula. Uma produção excessiva de ROS está associada a muitas doenças agudas e crônicas, incluindo a lesão de isquemia-reperfusão (IR), a doença cardiovascular, síndromes microvasculares, síndrome metabólica e câncer (Cap. 37). A XO, entre outras enzimas, contribui para a produção de um excesso de ROS nestas condições. Na IR, as ROS são produzidas durante a reperfusão do tecido, isto é, durante a fase de recuperação. O alopurinol, um inibidor da XO, está sendo avaliado como terapia adjuvante para limitar a produção de ROS durante a recuperação do infarto do miocárdio e do acidente vascular cerebral. Em contrapartida, a XO está também sendo conjugada com anticorpos antitumorais em estudos experimentais para direcionar a produção de ROS para o ambiente do tumor, de forma a matar as células tumorais. Assim, além da XO ser um ator principal no catabolismo de purinas, também desempenha outros papéis na patologia e na terapia.

Quadro clínico

Evolução reversa: a uricase como novo tratamento para gota refratária

A maioria dos fármacos empregados para tratar pacientes com gota tem sido usada há mais de 40 anos. Mais recentemente, à medida que o nosso conhecimento fisiológico sobre a gota foi melhorando, foram desenvolvidos novos tratamentos inovadores, como a terapia enzimática por administração da uricase. A pegloticase, uma uricase recombinante, é uma nova opção terapêutica para pacientes que sofrem de gota crônica e refratária. Ensaios humanos demonstram que a pegloticase mantém as concentrações de ácido úrico abaixo de 7 mg/dL em pacientes com gota crônica. Essas uricases recombinantes poderão ter seu lugar no tratamento da gota, particularmente em pacientes com gota severa e tofácea, com o objetivo de promover a dissolução dos tofos. A pegloticase é uma opção eficaz para pacientes com gota sintomática, para os quais os agentes hipouricêmicos existentes são malsucedidos ou contraindicados.

Resumo

- Os nucleotídios são sintetizados principalmente de precursores de aminoácidos e fosforribosilpirofosfato por vias complexas, com múltiplas etapas e metabolicamente

caras.

- O metabolismo de nucleotídio *de novo* é necessário para a proliferação celular, mas as vias de recuperação também desempenham um papel importante no metabolismo de nucleotídios.
- Ambas as classes de nucleotídios (purinas e pirimidinas) são sintetizadas como precursores (IMP, UMP), que são, então, convertidos em precursores de DNA (dATP, dGTP, dCTP, TTP).
- Com exceção do TTP, os ribonucleotídios são convertidos em desoxirribonucleotídios pela ribonucleotídio redutase. O TTP é sintetizado de dUMP por uma via especial envolvendo folatos.
- As vias de recuperação têm se mostrado úteis para a ativação de agentes farmacêuticos, enquanto a exclusividade da via de síntese de TTP tem fornecido um alvo especial para inibição quimioterapêutica da síntese de DNA e divisão celular em células cancerosas.
- Altas concentrações plasmáticas de ácido úrico, o produto final do catabolismo de purina no homem, podem levar a gota e cálculo renal.

Questões para aprendizagem

1. Comparar as funções da síntese *de novo* e das vias de recuperação da síntese de nucleotídios em vários tipos celulares, por exemplo, eritrócitos, linfócitos, músculo e fígado.
2. Além de sua atividade como um inibidor de xantina oxidase, que outras atividades do alopurinol podem contribuir para sua eficácia no tratamento da gota?
3. Discutir o uso de inibidores de timidilato sintetase e análogos de folato para o tratamento de outras doenças além do câncer (p. ex., artrite, psoríase).

Leituras sugeridas

Agarwal, A., Banerjee, A., Banerjee, U. C. Xanthine oxidoreductase: a journey from purine metabolism to cardiovascular excitation-contraction coupling. *Crit Rev Biotechnol*. 2011; 31:264–280.

Fang, J., Nakamura, H., Iyer, A. K. Tumor-targeted induction of oxystress for cancer therapy. *J Drug Target*. 2007; 15:475–486.

Gangjee, A., Jain, H. D., Kurup, S. Recent advances in classical and non-classical antifolates as antitumor and antiopportunistic infection agents. *Anticancer Agents Med Chem*. 2008; 8:205–231.

Garay, R. P., El-Gewely, M. R., Labaune, J. P., Richette, P. Therapeutic perspectives on uricases for gout. *Joint Bone Spine*. 2012; 79:237–242.

Jordan, K. M. Up-to-date management of gout. *Curr Opin Rheumatol*. 2012; 24:145–151.

Jurecka, A. Inborn errors of purine and pyrimidine metabolism. *J Inherit Metab Dis*. 2009; 32:247–263.

Lee, B. E., Toledo, A. H., Anaya-Prado, R., et al. Allopurinol, xanthine oxidase, and cardiac ischemia. *J Investig Med*. 2009; 57:902–909.

Nyhan, W. L. The recognition of Lesch–Nyhan syndrome as an inborn error of purine metabolism. *J Inherited Metab Dis*. 1997; 20:171–178.

Shannon, J. A., Cole, S. W. Pegloticase: a novel agent for treatment-refractory gout. *Ann Pharmacother*. 2012; 46:368–376.

Sigoillot, F. D., Berkowski, J. A., Sigoillot, S. M., et al. Cell cycle-dependent regulation of pyrimidine biosynthesis. *J Biol Chem*. 2003; 278:3403–3409.

Sites

Pictures of Gout: http://www.mediscan.co.uk/cfm/resultssearch.cfm?action= keyword&log=nk

Gout: www.niams.nih.gov/Health_Info/Gout/default.asp

Gout: Lesch–Nyhan: http://emedicine.medscape.com/article/1181356-overview

Gout: Purine and pyrimidine metabolism disorders: http://www.merckmanuals.com/professional/pediatrics/inherited_disorders_of_metabolism/purine_and_pyrimidine_r

Gout: SCIDS: www.scid.net http://themedicalbiochemistrypage.org/nucleotide- metabolism.php

CAPÍTULO 32

Ácido Desoxirribonucleico

Robert Thornburg and Alejandro Gugliucci

Objetivos

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever a composição e a estrutura do DNA baseada no modelo de Watson-Crick, incluindo os conceitos de direcionalidade e complementaridade na estrutura do DNA.
- Descrever o processo de empacotamento do DNA no núcleo.
- Explicar como a replicação do DNA é realizada com alta fidelidade.
- Discutir as enzimas envolvidas, as atividades nas forquilhas de replicação e as estruturas e os intermediários que participam do processo de replicação.
- Descrever o mecanismo pelo qual a replicação é controlada na célula eucariótica.
- Descrever os tipos de danos ao DNA e os mecanismos envolvidos no reparo desta molécula.
- Descrever o mecanismo de ação do AZT para o tratamento da AIDS.

Introdução

Os ácidos nucleicos celulares existem sob duas formas, ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA). Aproximadamente 90% dos ácidos nucleicos presentes nas células encontram-se sob a forma de RNA e o restante é DNA. O DNA é o reservatório da informação genética. Este capítulo trata da estrutura do DNA, da maneira pela qual ele está armazenado nos cromossomos dentro do núcleo, e dos mecanismos envolvidos na sua biossíntese e no seu reparo.

Estrutura do ácido desoxirribonucleico

O DNA é um dímero antiparalelo de fitas de ácidos nucleicos

O DNA é composto por nucleotídios contendo o açúcar desoxirribose. A desoxirribose não contém o grupamento hidroxila na posição 2′. As cadeias de DNA são polimerizadas por meio de ligações fosfodiéster entre o grupamento 3′-hidroxila de uma ribose e o grupamento 5′-fosfato da ribose seguinte (Fig. 32.1A). Assim, o DNA é um polímero linear duplex de desoxirribose 3′,5′-fosfato, com as bases purínicas e pirimidínicas ligadas ao carbono-1′ da subunidade desoxirribose.

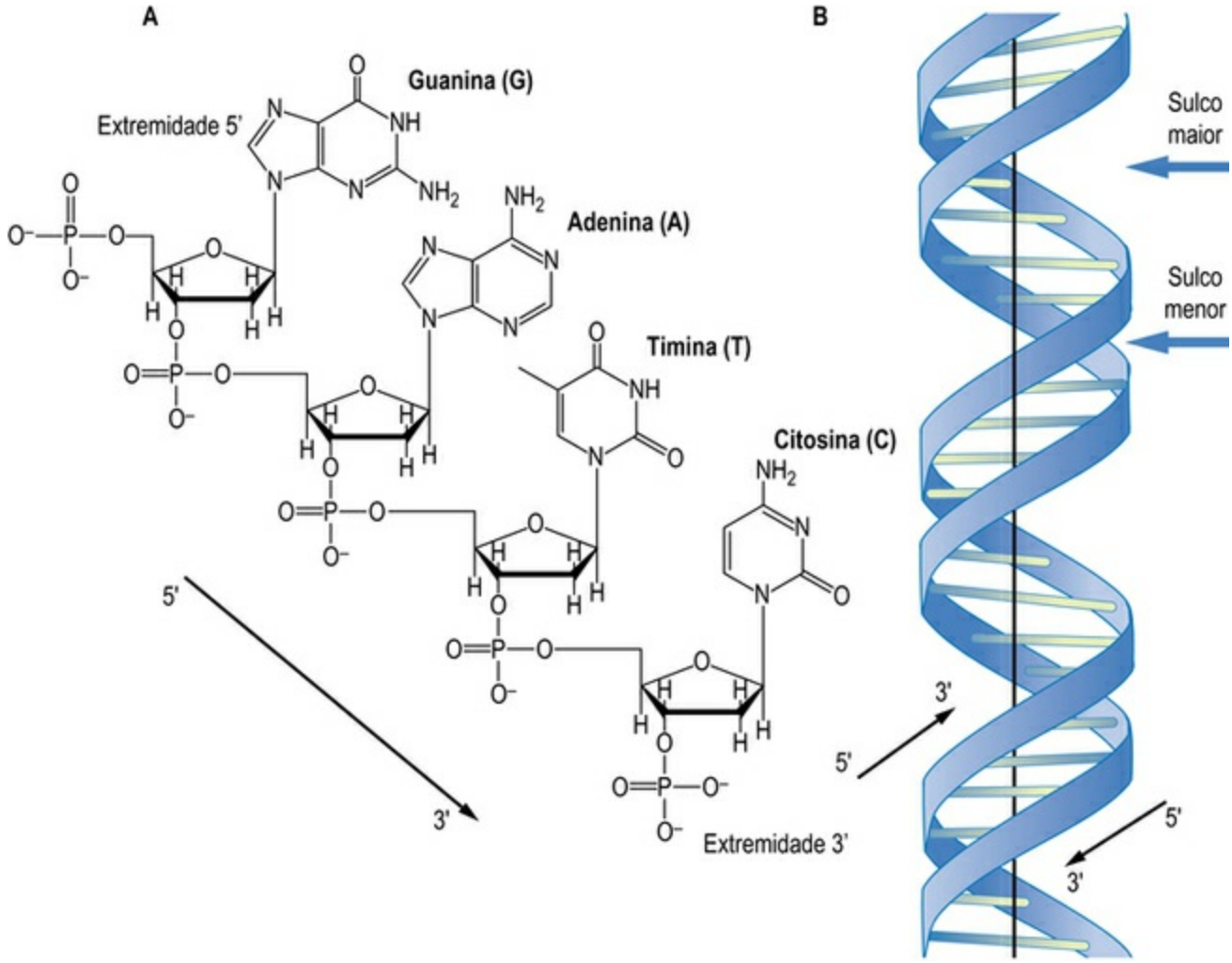


FIG. 32.1 Estrutura do DNA.
(A) Uma sequência de tetranucleotídios de DNA mostrando cada um dos nucleotídios normalmente encontrados nesta molécula. Os açúcares desoxirribose não apresentam a 2'-hidroxila que está presente nos açúcares ribose encontrados no RNA. Por convenção, o DNA é lido da extremidade 5' para a extremidade 3', dessa forma a sequência deste tetranucleotídio é 5'-GATC-3'. **(B)** Uma representação gráfica da estrutura do B-DNA, a principal forma de DNA na célula. Os pares de bases no centro são alinhados quase que perpendicularmente ao eixo helicoidal. O sulco maior e o sulco menor são mostrados. Observe que as fitas são antiparalelas.

Utilizando fotografias de difração de raios-X do DNA, tiradas por Rosalind Franklin, James Watson e Francis Crick propuseram, em 1953, a estrutura do DNA. Esse modelo propôs que o DNA era composto por **duas fitas complementares emparelhadas** entre si e mantidas juntas por pontes de hidrogênio (Fig. 32.1B). A simplicidade básica desta estrutura foi consistente com a observação de que, em todo o DNA, o conteúdo molar de A é igual ao de T, e de que o conteúdo molar de G é igual àquele de C. Embora alguns detalhes do modelo tenham sido modificados, a hipótese de Watson e Crick foi

rapidamente aceita, e seus elementos essenciais permaneceram inalterados desde a sua proposta original.

O modelo de DNA de Watson e Crick

Conforme originalmente apresentado por Watson e Crick, o DNA é composto por duas fitas enoveladas uma na outra em uma estrutura helicoidal dextrogira (voltas em sentido horário), com os pares de bases no centro e as cadeias de desoxirribosil fosfato na parte externa. A orientação das fitas de DNA é **antiparalela,** ou seja, as fitas se posicionam em direções opostas. As bases dos nucleotídios de cada uma das fitas interagem com as bases de nucleotídios da outra fita para formar os pares de bases (Fig. 32.2). Estes são planos e orientados quase que perpendicularmente ao eixo da hélice. Cada par de bases é formado por pontes de hidrogênio entre uma purina e uma pirimidina. Em conformidade com esse emparelhamento, a guanina forma três pontes de hidrogênio com a citosina, e a adenina forma duas pontes de hidrogênio com a timina. Por causa da especificidade dessa interação entre purinas e pirimidinas nas fitas opostas, diz-se que estas fitas de DNA possuem estruturas complementares. A força resultante das numerosas pontes de hidrogênio formadas entre as bases das fitas opostas e as interações hidrofóbicas entre essas bases são responsáveis pela extrema estabilidade da dupla hélice de DNA. Enquanto as pontes de hidrogênio entre as fitas são afetadas por temperatura e força iônica, estruturas complementares estáveis podem ser formadas em temperatura ambiente com apenas seis a oito nucleotídios.

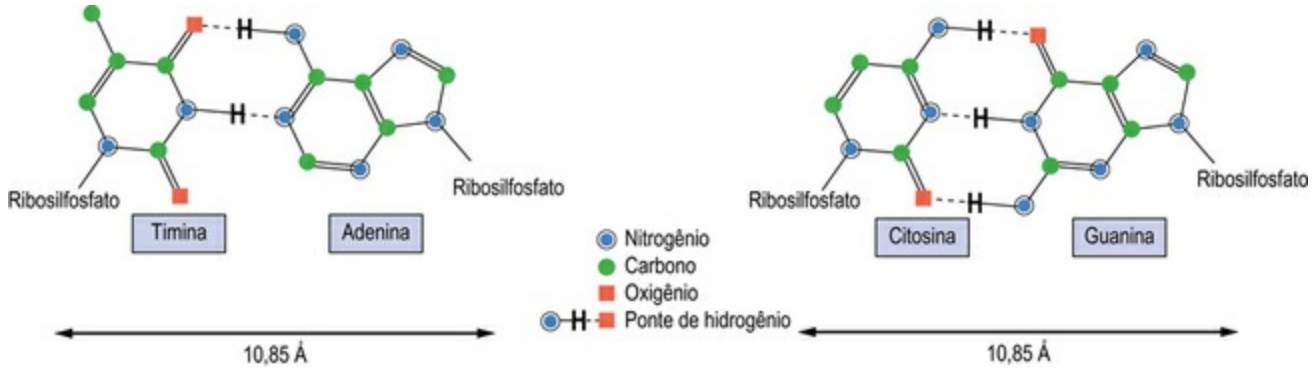


FIG. 32.2 Modelo Watson-Crick do pareamento de nucleotídios no DNA.
Os pares de bases AT formam duas pontes de hidrogênio e os pares de bases CG formam três pontes de hidrogênio. Portanto, regiões ricas em CG são mais estáveis do que as regiões ricas em AT.

O DNA tridimensional

A estrutura tridimensional do DNA **dupla hélice** é de tal forma que os esqueletos de desoxirribosil fosfato das duas fitas são ligeiramente deslocados do centro da hélice. Por causa disso, os sulcos entre as duas fitas possuem tamanhos diferentes. Estes sulcos são denominados sulco maior e sulco menor (Fig. 32.1B). O sulco maior é mais aberto e expõe os pares de bases dos nucleotídios. O sulco menor é mais apertado, sendo parcialmente bloqueado pelo conteúdo de desoxirribosil que liga os pares de bases. A ligação de

proteínas ao DNA ocorre principalmente no sulco maior e é específica para a sequência de nucleotídios do DNA.

Formas alternativas do DNA podem auxiliar a regular a expressão gênica

Embora a maior parte das moléculas de DNA em uma célula exista sob a forma B descrita, formas alternativas de DNA também existem. Quando a umidade relativa da forma B cai a menos de 75%, esta forma sofre uma transição reversível para a forma A do DNA. Na forma A, os pares de bases dos nucleotídios se apresentam inclinados 20° em relação ao eixo helicoidal e o diâmetro da hélice é maior quando comparado ao da forma B (Fig. 32.3). A forma A é observada quando as cadeias do DNA contêm porções de resíduos de polipurinas (e polipirimidinas complementares). Essas regiões não se ligam eficientemente a histonas e são, portanto, incapazes de formar nucleossomos (ver adiante), resultando em regiões do DNA livres de nucleossomos (expostas).

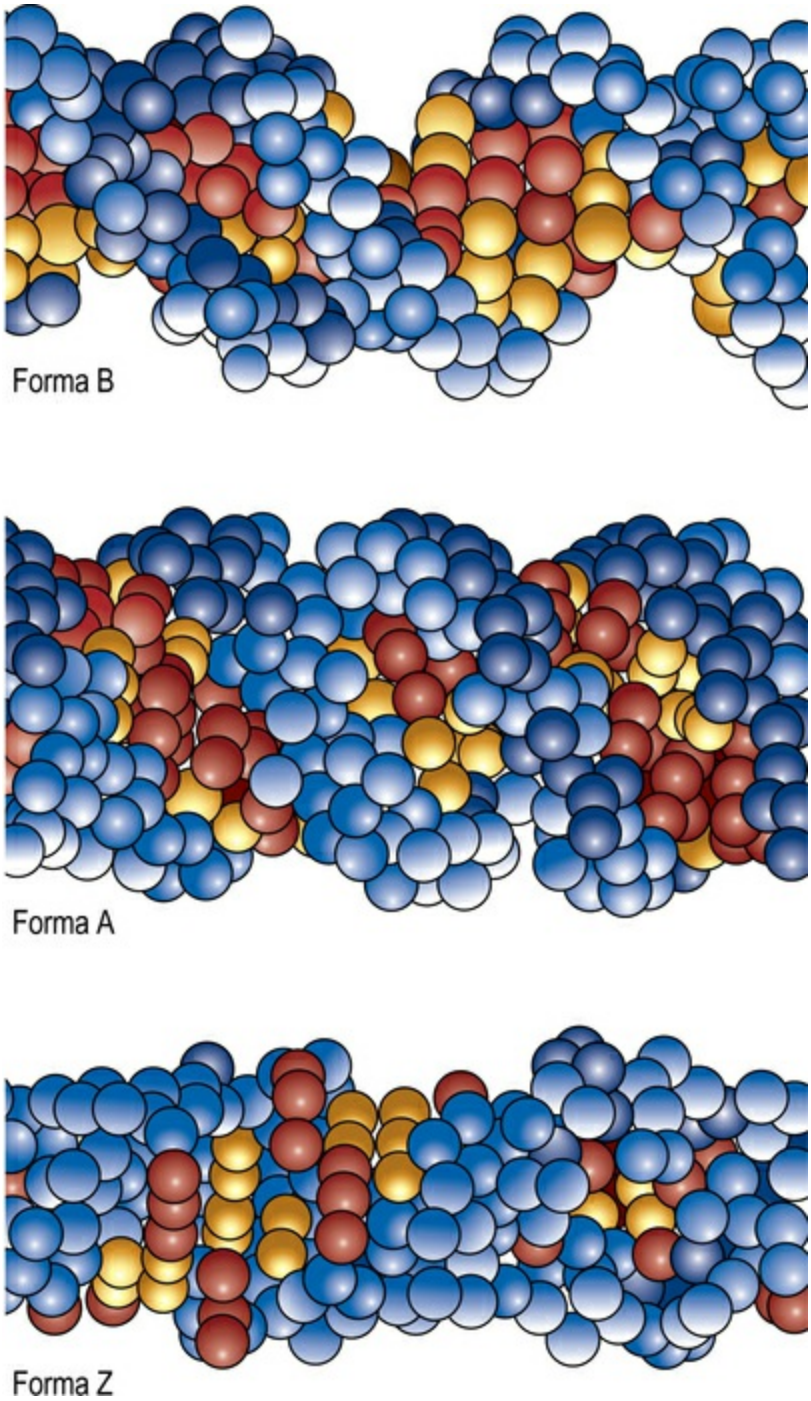


FIG. 32.3 As estruturas de diferentes formas do DNA, incluindo as formas B, A e Z. O esqueleto de açúcar-fosfato das fitas do DNA está representado em azul. As bases de nucleotídios que formam os pares de bases internos estão representadas em amarelo, no caso das pirimidinas (timina e citosina), e em vermelho, no caso das purinas (adenina e guanina).

Outra forma única de DNA existe quando a sequência de nucleotídios consiste em expansões alternadas de purina/pirimidina. Essa forma, denominada Z-DNA, é também favorecida em altas concentrações iônicas. No Z-DNA, os pares de bases giram 180° em relação à ligação ao açúcar do nucleotídio. Isto resulta em uma nova conformação dos pares de bases em relação aos esqueletos de açúcar-fosfato, gerando uma forma de DNA com uma configuração em zigue-zague (daí o nome Z-DNA) ao longo do esqueleto de açúcar-fosfato. Surpreendentemente, esta mudança conformacional leva à formação de uma hélice de DNA voltada para a esquerda. Embora a forma Z-DNA seja favorecida em elevadas concentrações iônicas, ela pode também ser induzida em concentrações iônicas normais por metilação de resíduos de citosina, uma forma de **modificação epigenética** do

DNA (Cap. 35). As interações de ligação com proteínas a essas formas alternativas de DNA, que são amplamente distribuídas no genoma, estão envolvidas na regulação da expressão gênica.

O código linear digital (pareamento de bases) na hélice dupla de DNA tem um componente significativo que atua alterando a forma e a rigidez da molécula ao longo de seu comprimento. Deste modo, uma região do DNA é estruturalmente diferenciada da outra, o que proporciona outro nível de informação codificada no espaço tridimensional. Estas variações locais de forma e rigidez contribuem com uma estrutura super-helicoidal e interações espaciais tridimensionais para o DNA. Pode-se dizer que a densidade super-helicoidal se comporta como um modo regulador análogo, ao contrário do mais frequentemente aceito conteúdo de informações puramente digital.

Fitas de DNA separadas podem se reassociar para formar o DNA duplex

As cadeias complementares do DNA hibridizam espontaneamente para formar estruturas helicoidais

Como as fitas de DNA são complementares e mantidas juntas somente por forças não covalentes, elas podem ser separadas nas fitas individuais. Essa separação das fitas, ou desnaturação do DNA, é comumente induzida pelo aquecimento da solução. A dissociação é reversível, e, em condições de resfriamento, as sequências de nucleotídios complementares se reassociam ou reanelam para formar novamente seus pares de bases originais. Esta é a base de um dos principais métodos de análise do DNA, a **hibridização por *Southern*** (Cap. 36). Como adenina e timina interagem por meio de duas pontes de hidrogênio, e guanina e citosina por meio de três (Fig. 32.2), as regiões do DNA ricas em AT se dissociam em temperaturas mais baixas do que as regiões ricas em CG. A desnaturação do DNA pode também ser induzida localmente por enzimas ou proteínas que se ligam ao DNA. A região promotora do DNA consiste em uma sequência TATA (TATA box; Fig. 35.1), uma região do DNA facilmente dissociada que facilita o desenovelamento do DNA durante os estágios iniciais da expressão gênica (Cap. 35).

O genoma humano

O genoma humano contém de 20.000 a 25.000 genes codificadores de proteínas distribuídos em 23 pares de cromossomos

Os genes para proteínas específicas representam sequências singulares do DNA que estão presentes em cópias únicas ou no máximo em apenas poucas cópias por genoma. Existem também vários tipos de sequências repetidas de DNA dentro do genoma. Estas estão divididas em duas classes principais: sequências moderadamente repetitivas (<10 cópias por genoma) e sequências altamente repetitivas (>10 cópias por genoma).

Algumas sequências moderadamente repetitivas do DNA consistem em genes que

codificam ácidos ribonucleicos de transferência e ribossomais, os quais estão envolvidos na síntese de proteínas (Cap. 34), e histonas, que são proteínas integrantes do nucleossomo (a seguir). Outras sequências moderadamente repetitivas do DNA não possuem uma função útil conhecida, porém podem participar da associação das fitas de DNA e dos rearranjos cromossômicos durante a meiose. A sequência repetitiva mais bem caracterizada em humanos é conhecida como sequência Alu. Entre 300.000 a 500.000 repetições Alu I com cerca de 300 pares de bases estão distribuídas ao longo do genoma humano, compreendendo de 3 a 6% do DNA total. Repetições individuais da sequência Alu podem variar de 10 a 20% de identidade. Sequências similares são encontradas em outros mamíferos e em eucariotos inferiores.

DNA satélite

O DNA satélite foi originalmente identificado como uma subfração do DNA com uma densidade de flutuação ligeiramente menor do que a do DNA genômico por causa de seu conteúdo maior de pares de bases AT. Ele consiste em agrupamentos de sequências pequenas, específicas da espécie, praticamente idênticas, que são repetidas em série por centenas de milhares de vezes. Esses agrupamentos são deficientes nos genes que codificam proteínas e são encontrados principalmente próximo aos centrômeros dos cromossomos, sugerindo que eles possam funcionar alinhando os cromossomos durante a divisão celular para facilitar a recombinação. Como essas sequências repetitivas cobrem longas extensões dos cromossomos (centenas a milhares de pares de quilobases; kb), a determinação das sequências dos DNA-satélites e o sequenciamento da região do centrômero do DNA representam os principais desafios para se completar o sequenciamento não codificante dos genomas eucarióticos.

DNA mitocondrial

O núcleo de células eucarióticas contém a maior parte do DNA da célula — o DNA genômico. Entretanto, o DNA também é encontrado na mitocôndria e em cloroplastos de plantas, o que é compatível com **teorias endossimbióticas** sobre a origem dessas organelas celulares: que diz que elas são parasitas que se adaptaram à vida intracelular durante a simbiose.

O genoma mitocondrial tem um tamanho pequeno, é circular e codifica relativamente poucas proteínas

Nos seres humanos, o genoma mitocondrial codifica 22 tRNAs, dois rRNAs e 13 proteínas mitocondriais que estão envolvidas no aparato respiratório, incluindo subunidades da NADH desidrogenase, citocromo b, citocromo oxidase e ATPase.

O restante das proteínas encontradas na mitocôndria (cerca de 1.000) é produzido de genes nucleares, sintetizado no citoplasma nos ribossomos "livres" (Cap. 34) e, então, importado para a mitocôndria. Esse processo de importação requer uma **sequência** *N*-terminal especial de **importação para a mitocôndria,** com cerca de 25 aminoácidos, a qual forma uma hélice anfipática que interage com proteínas transportadoras e chaperonas nas membranas mitocondriais interna e externa e na matriz mitocondrial. Essas poucas

proteínas codificadas pelo genoma mitocondrial são sintetizadas na mitocôndria utilizando uma maquinaria similar a que é usada no citoplasma para a síntese de proteínas não mitocondriais (Cap. 34).

O DNA está compactado em cromossomos

Os cromossomos são formas compactas e altamente organizadas de DNA

Em eucariotos, o DNA está disposto em segmentos lineares chamados cromossomos. Cada cromossomo contém entre 48 milhões e 240 milhões de pares de bases. A forma B do DNA tem um comprimento de 3,4 Å por par de bases. Consequentemente, os cromossomos possuem comprimentos de 1,6 a 8,2 cm, o que é muito maior do que uma célula. Para caber dentro do núcleo, o DNA é condensado mais de 8.000 vezes em uma estrutura organizada. As interações entre o DNA e cátions móveis, tais como Na^+, Mg^{2+} e poliaminas, como espermidina, desempenham um importante papel nas propriedades físicas e nas funções biológicas do DNA. Mesmo em soluções diluídas, aproximadamente três de quatro cargas no DNA são neutralizadas por um cátion que está de algum modo "ligado". Essa neutralização facilita a compactação do DNA em cromatina densamente empacotada e a deformação do DNA por proteínas.

A cromatina contém DNA, RNA e proteínas, assim como contraíons inorgânicos e orgânicos

No cromossomo nativo, o DNA está complexado com o RNA e com uma massa aproximadamente igual de proteínas. Esses complexos DNA-RNA-proteína são denominados cromatina. A maior parte das proteínas na cromatina é histona. As histonas constituem uma família de proteínas altamente conservadas que estão envolvidas no empacotamento e dobramento do DNA dentro do núcleo. Existem cinco classes de histonas, chamadas H1, H2A, H2B, H3 e H4. Todas são ricas (>20%) em aminoácidos básicos (lisina e arginina) carregados positivamente. Essas cargas positivas interagem com os grupamentos fosfatos das fitas do DNA carregados negativamente para reduzir a repulsão eletrostática e permitir um empacotamento mais forte do DNA.

Os nucleossomos são os blocos construtores da cromatina

As proteínas histonas se associam a um complexo denominado nucleossomo (Fig. 32.4). Cada um desses complexos contém duas moléculas de cada uma das histonas H2A, H2B, H3 e H4, e uma molécula de H1. O complexo proteico nucleossomal encontra-se envolvido com cerca de 200 pares de bases do DNA que formam duas espirais em torno do cerne do nucleossomo. A proteína H1 se associa à parte externa do cerne do nucleossomo, estabilizando o complexo. Com a formação de nucleossomos, a densidade de empacotamento do DNA é aumentada cerca de sete vezes.

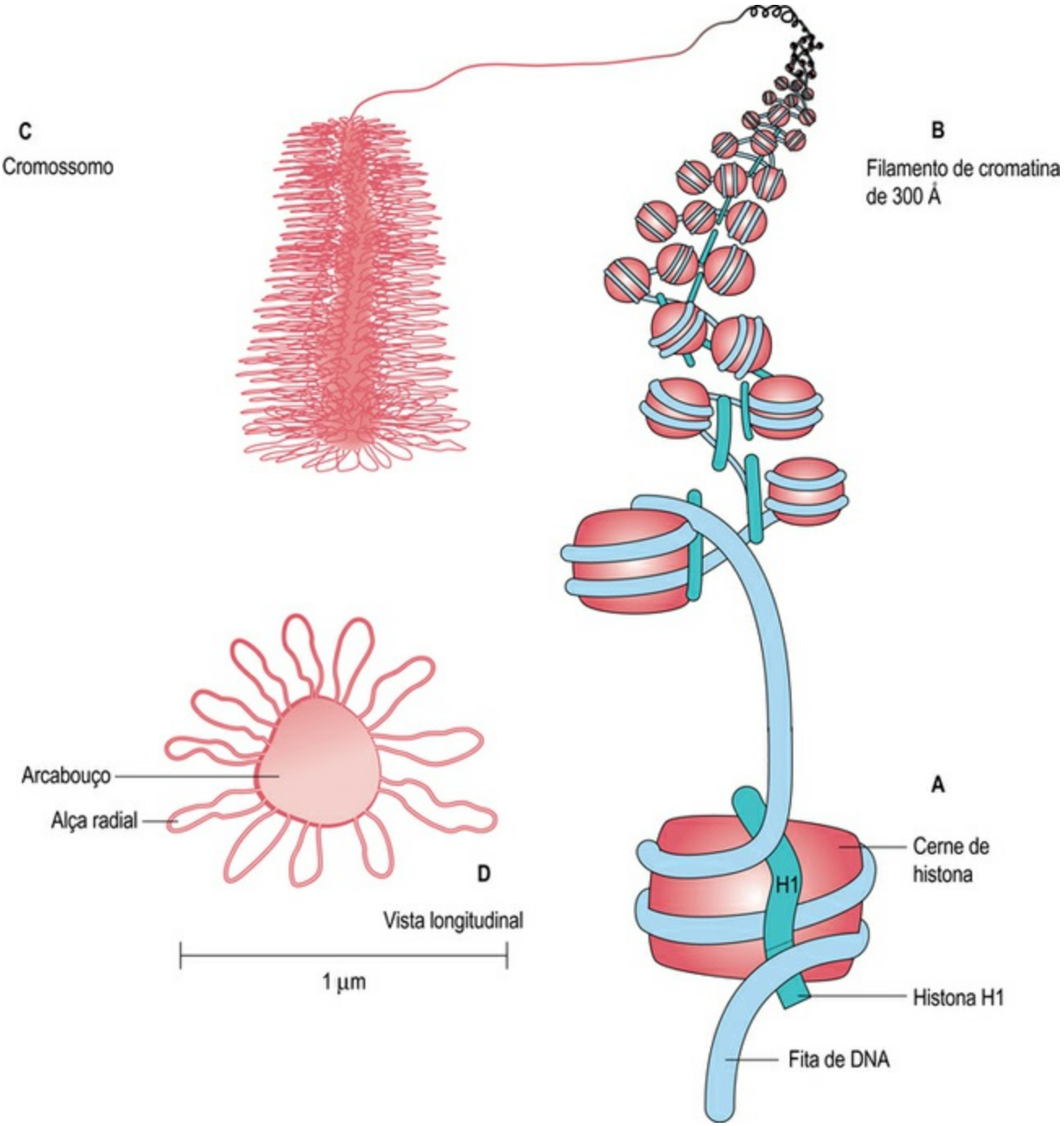


FIG. 32.4 Estruturas envolvidas no empacotamento dos cromossomos.
(A) O cerne do nucleossomo é composto de duas subunidades de cada uma das histonas H2A, H2B, H3 e H4. O cerne é enrolado duas vezes com o DNA, e a histona H1 se liga ao complexo completo. **(B)** O filamento de cromatina de 300 Å é formado pelo enrolamento dos nucleossomos em uma estrutura solenoide de forma espiralada. **(C)** O cromossomo é composto de filamentos de 300 Å, o qual se liga ao arcabouço nuclear, formando grandes alças de material de cromatina. **(D)** A vista longitudinal de um cromossomo mostra o arcabouço nuclear central envolvido pelas alças radiais de cromatina. O diâmetro de um cromossomo é de cerca de 1 µm.

As partículas de nucleossomos por si próprias também são organizadas em outras estruturas mais fortemente compactadas, chamadas filamentos de cromatina de 300 Å. Esses filamentos são construídos pelo enrolamento das partículas de nucleossomos em uma estrutura solenoide de forma espiralada com cerca de seis nucleossomos por volta (Fig. 32.4). O solenoide é estabilizado pelas associações das extremidades (do tipo cabeça a cauda) das histonas H1. Finalmente, os filamentos de cromatina são compactados no cromossomo maduro, usando um arcabouço nuclear. Esse arcabouço possui cerca de

400 nm de diâmetro e forma o cerne dos cromossomos. Os filamentos estão dispersos em torno do arcabouço formando alças radiais de cerca de 300 nm de comprimento. O diâmetro final do cromossomo é de aproximadamente 1 μm.

Telômeros

Os telômeros são complexos nucleoproteicos que tampam as extremidades 3′ dos cromossomos eucarióticos. São essenciais à viabilidade celular. Essas estruturas consistem em repetições em *tandem* de oligonucleotídios específicos da espécie, ricos em G e curtos. Em humanos, a sequência repetida é TTAGGG. Os telômeros podem conter tantas quantas 1.000 cópias desta sequência. Durante a síntese dos telômeros, a enzima **telomerase,** um complexo ribonucleoproteico, adiciona repetições hexanucleotídicas pré-formadas à extremidade 3′ do cromossomo, usando seu RNA como molde; não é necessário um molde de DNA. Em células humanas somáticas, o DNA telomérico encurta a cada divisão celular até não poder exercer mais suas funções protetoras das extremidades, por exemplo, evitando o reconhecimento das extremidades dos cromossomos como quebras da cadeia dupla. O encurtamento dos telômeros após muitas replicações celulares foi associado ao desenvolvimento da senescência celular. Se os telômeros se revelarem disfuncionais como resultado de um encurtamento desproporcionado ou de defeitos em suas proteínas intrínsecas, desencadeiam vias que restringem o tempo de vida proliferativo. A instabilidade cromossômica baseada em telômeros foi proposta como uma força motriz da oncogênese.

O ciclo celular em eucariotos

A Figura 32.5 mostra as várias fases do crescimento e divisão de células eucarióticas, conhecido como ciclo celular. A fase G1 é um período de crescimento celular que ocorre anteriormente à replicação do DNA. A fase durante a qual o DNA é sintetizado ou replicado é chamada fase S. Uma segunda fase de crescimento, denominada G2, ocorre após a replicação do DNA, porém antes da divisão celular. A mitose, ou fase M, é o período de divisão celular. Após a mitose, as células filhas entram novamente na fase G1 ou entram em uma fase quiescente denominada G0, quando o crescimento e a duplicação cessam. A passagem das células pelo ciclo celular é rigorosamente controlada por uma variedade de proteínas denominadas cinases dependentes de ciclina (Cap. 42).

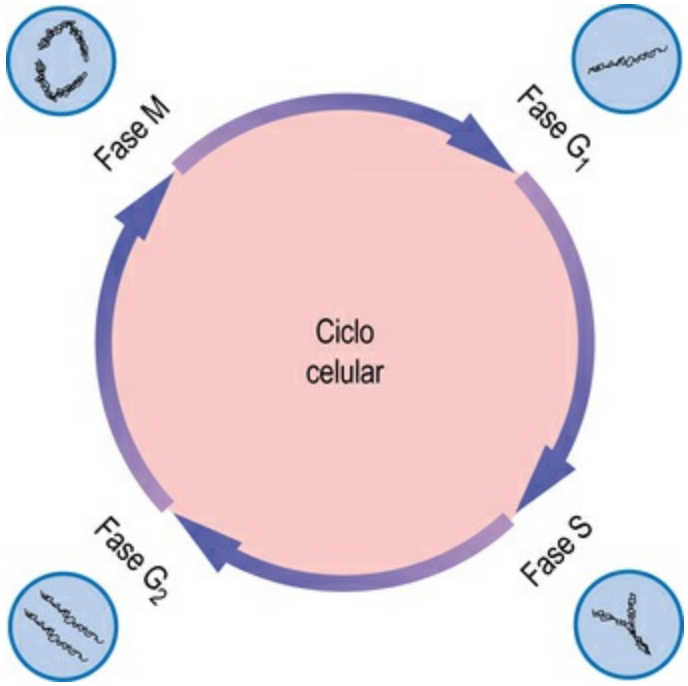


FIG. 32.5 Estágios do ciclo celular.
G_1 e G_2 são fases de crescimento que ocorrem antes e depois da síntese de DNA, respectivamente. A replicação do DNA ocorre durante a fase S. A mitose ocorre durante a fase M, resultando em duas células filhas novas que podem entrar novamente na fase G_1 (compare com a Figura 43.1).

Replicação do DNA

O DNA é replicado pela separação e cópia das fitas

Para as células se dividirem seu DNA deve ser duplicado durante a fase S do ciclo celular. A estrutura do DNA dupla hélice e sua complementaridade sugerem o mecanismo para a replicação do DNA — separação das fitas seguida de cópia destas. As fitas parentais separadas servem como molde para a síntese de novas fitas filhas. Este método de replicação do DNA é descrito como **semiconservativo** — em cada duplex replicado, a molécula de DNA filha contém uma fita parental e uma fita recém-sintetizada.

Replicação do DNA

O local no qual a replicação do DNA se inicia é chamado origem de replicação

Em procariotos, uma proteína de ligação do DNA, chamada DnaA, liga-se a sequências repetidas de nucleotídios localizadas na origem. A ligação de 20 a 30 moléculas de DnaA à origem de replicação induz o desenovelamento, o que separa as fitas em uma região rica em AT adjacente aos sítios de ligação da DnaA. Em seguida, a proteína hexamérica DnaB se liga às fitas de DNA separadas. A DnaB possui atividade de **helicase,** catalisando o desenovelamento mediado por ATP da hélice de DNA. A DNA **girase** também participa da separação das fitas. Como esse complexo continua a desenovelar as fitas de DNA em ambas as direções partindo da origem de replicação, proteínas que se ligam ao DNA de

fitas simples revestem as fitas separadas para inibir sua reassociação.

Quando as fitas se encontram devidamente separadas, outra proteína, denominada DNA **primase,** é adicionada, resultando na formação do **complexo primossomo** na forquilha de replicação. O primossomo sintetiza oligonucleotídios de RNA curtos (n ≤10) complementares a cada cadeia de DNA parental. Esses oligonucleotídios servem como iniciadores para a síntese de DNA. Quando cada iniciador de RNA tiver sido posicionado, dois complexos de **DNA polimerase III** são montados, um em cada sítio, com os devidos iniciadores. Por causa da atividade sintética unidirecional da polimerase e a natureza antiparalela das duas fitas, a síntese de DNA ao longo das duas fitas é diferente (Fig. 32.6). As duas fitas filhas que estão sendo sintetizadas são denominadas fita contínua e fita descontínua. Além de sua atividade polimerase, uma das subunidades da DNA polimerase III tem uma atividade exonuclease **de revisão,** que corrige pareamentos errôneos e assegura a fidelidade na replicação do DNA.

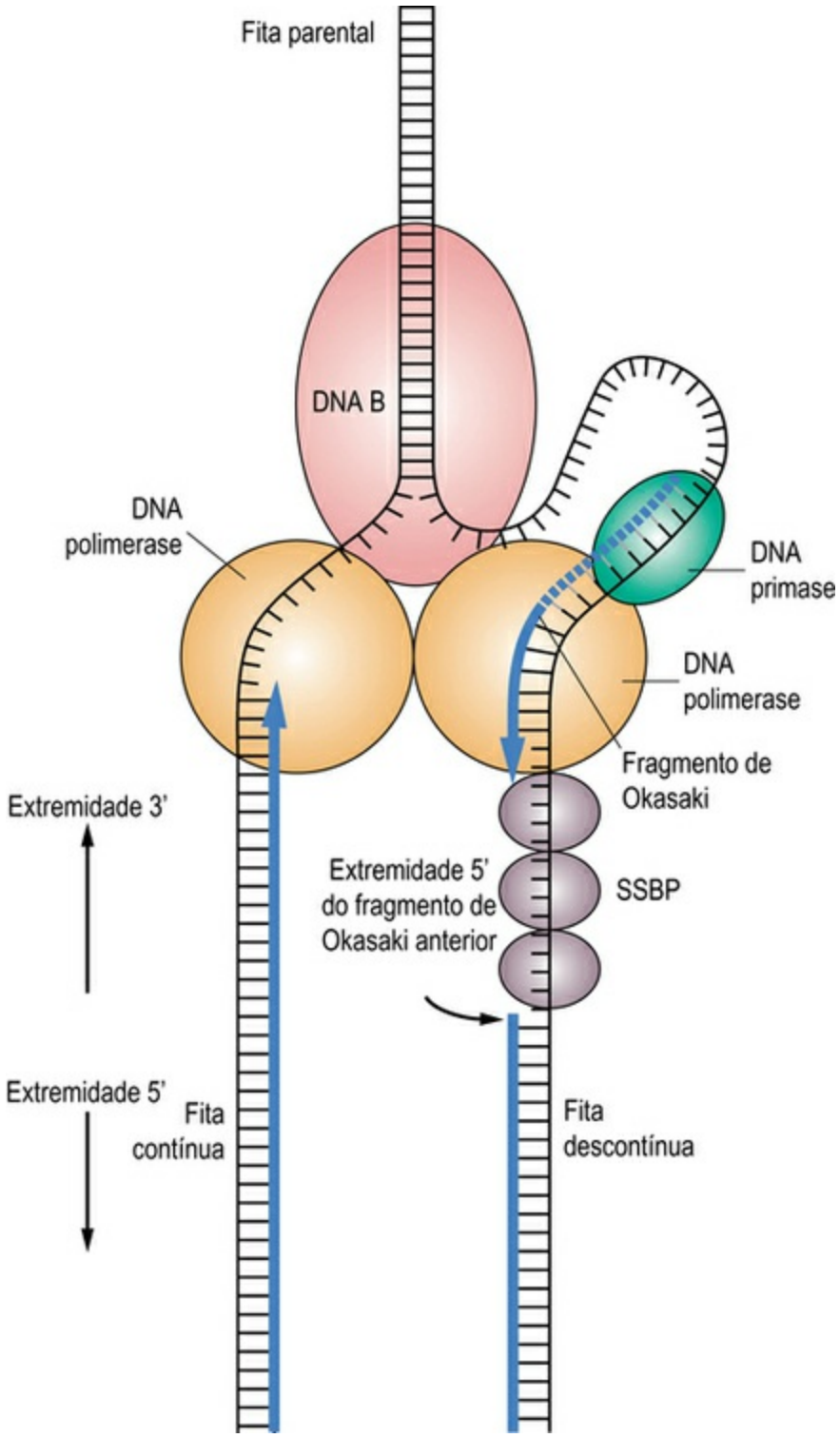


FIG. 32.6 Síntese de DNA.
A síntese de DNA ocorre em uma forquilha de replicação, produzindo novas fitas denominadas fita contínua e fita descontínua. Os "trilhos" representam o DNA de fita dupla. Algumas das enzimas envolvidas na síntese de DNA são mostradas: DNA B (helicase), DNA primase, DNA polimerase e proteína que se liga a DNA de fita simples (SSBP). A fita contínua é replicada continuamente. Entretanto, para a fita descontínua, os iniciadores de RNA são periodicamente adicionados pela DNA primase ao longo da fita. A DNA polimerase III alonga esses iniciadores de RNA para formar fragmentos de Okasaki. Quando o fragmento de Okasaki está completo, a DNA polimerase III na fita descontínua se deslocará para o iniciador de RNA seguinte para iniciar outro fragmento de Okasaki. A atividade de exonuclease da DNA polimerase I remove os iniciadores de RNA e os substitui por DNA. A DNA ligase sela as lacunas nas fitas de DNA para completar a síntese da fita descontínua.

A síntese de DNA prossegue em direções opostas ao longo das cadeias liderança e atraso do DNA molde

A síntese de DNA se passa ao longo da fita contínua na direção 5′ para 3′, produzindo uma fita simples, longa e contínua. Entretanto, como a síntese de DNA adiciona novos nucleotídios somente na extremidade 3′ da fita de DNA que está sendo formada, a DNA polimerase III não pode sintetizar a fita descontínua em um pedaço contínuo e longo, tal como é feito para a fita contínua. Em vez disso, a fita descontínua é sintetizada em pequenos fragmentos, de 1.000 a 5.000 pares de bases de comprimento, denominados **fragmentos de Okasaki** (Fig. 32.6). O primossomo permanece associado à fita descontínua e continua periodicamente a sintetizar iniciadores de RNA complementares à fita de DNA separada. À medida que a DNA polimerase III se move ao longo da fita de DNA parental, ela inicia a síntese dos fragmentos de Okasaki nos iniciadores de RNA, alongando diferentes fragmentos e cada iniciador.

Quando a extremidade 3′ do fragmento de Okasaki crescente alcança a extremidade 5′ do fragmento de Okasaki sintetizado anteriormente, a DNA polimerase III libera o molde e encontra outro iniciador de RNA mais adiante ao longo da fita descontínua, sintetizando outro fragmento de Okasaki. Por fim os fragmentos de Okasaki são unidos pela **DNA polimerase I.** Esta enzima, que também possui uma função no reparo do DNA, tem uma atividade de exonuclease que permite remover e substituir uma extensão de nucleotídios à medida que ela prossegue ao longo de um DNA molde. Durante a replicação do DNA, a DNA polimerase I remove o iniciador de RNA e o substitui por DNA. Finalmente, a DNA **ligase** une os fragmentos de DNA da fita descontínua para formar uma fita contínua.

Os eucariotos regulam rigorosamente a replicação do DNA

A síntese de DNA em eucariotos é notavelmente similar à síntese de DNA em procariotos. Entretanto, os eucariotos possuem muito mais origens de replicação. Estas são ativadas simultaneamente durante a fase S do ciclo celular, permitindo uma rápida replicação de todo o cromossomo. Para assegurar que quantidades excessivas de segmentos de DNA que estão se replicando mas estão inacabados não se acumulem, as células utilizam uma proteína chamada **fator licenciador,** que está presente no núcleo antes da replicação. Após cada ciclo de replicação este fator é inativado ou destruído, prevenindo uma replicação posterior até que mais fator licenciador seja posteriormente sintetizado no ciclo celular.

O fator licenciador é mais bem compreendido em leveduras. Nelas existe um complexo denominado complexo de reconhecimento da origem (ORC), composto por seis proteínas. O ORC marca a origem de replicação e permanece ligado à origem ao longo do ciclo celular. Ele serve como um sítio de ancoragem para outros componentes que regulam a replicação do DNA. Eventos iniciais da replicação do DNA incluem a ligação de várias proteínas altamente instáveis ao ORC. Essas proteínas incluem as CDC6/18 e CDT1, as quais facilitam a ligação de um grupo de três proteínas adicionais: MCM2, MCM3 e MCM5. Quando as proteínas MCM se ligam, a origem existe como um complexo de pré-replicação, tornando-se "licenciada" ("autorizada") para entrar na fase S do ciclo celular. A iniciação da síntese de DNA é desencadeada pela ação da cinase CDC7 juntamente com outras **cinases dependentes de ciclinas.** Em seguida, o complexo MCM

ativado participa do desenovelamento da origem de replicação e, assim, é deslocado da origem. Após o deslocamento, a origem forma um complexo de pós-iniciação e a CDC6 é degradada, prevenindo, dessa forma, uma nova exposição da origem com fatores licenciadores adicionais.

Quadro clínico

Terapia da infecção por hiv com AZT

A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) resulta em um profundo enfraquecimento do sistema imune, deixando o paciente suscetível a uma variedade de superinfecções por bactérias, fungos, protozoários e vírus. O **sarcoma de Kaposi** pode também se desenvolver; é uma doença tipo câncer dos vasos sanguíneos causada pela infecção pelo herpesvírus humano 8 (HHV-8).

Tratamentos efetivos da infecção por HIV contam com o conhecimento detalhado do ciclo de vida do vírus. Para o vírus da AIDS, o genoma viral é RNA. Na célula infectada, este RNA é copiado a uma forma de DNA por uma enzima viral denominada **transcriptase reversa.** Essa enzima é propensa a erros uma vez que não possui a capacidade de edição da DNA polimerase III. Uma abordagem terapêutica para o tratamento da AIDS beneficia-se da falta de especificidade da enzima na escolha de substratos complementares. Diversos fármacos antivirais importantes são análogos nucleotídicos que inibem a transcriptase reversa, incluindo o AZT (azido-2′,3′-didesoxitimidina; Retrovir®, zidovudina), ddC (2′,3′-didesoxicitidina; Hivid®, zalcitabina) e 3TC (2′,3′-didesoxi- 3′-tiacitidina; Epivir®, lamivudina) (Fig. 32.7). O AZT, por exemplo, é metabolizado no organismo em um análogo de trifosfato de timidina (TTP), o azido-TTP. A transcriptase reversa do HIV incorpora o azido-TTP no genoma viral que sofreu a transcrição reversa. A incorporação do azido-TTP bloqueia o alongamento da cadeia, porque o grupamento 3′-azido não pode formar uma ligação fosfodiéster com o trifosfato de nucleosídio subsequente. A incapacidade de sintetizar DNA do molde de RNA viral resulta em inibição da replicação viral. O ciclo de vida do HIV compreende cerca de um dia e meio desde a entrada em uma célula, replicação, montagem e liberação de novas partículas virais para a infecção de outras células. O HIV é desprovido de enzimas de revisão que corrijam os erros que ocorrem durante a conversão de seu RNA em DNA, via transcrição reversa. Seu curto ciclo de vida e elevada taxa de erro fazem com que o vírus sofra mutações de forma rápida, causando a grande variabilidade genética do HIV. A maioria das mutações é nociva ou não traz vantagem, mas algumas têm uma vantagem seletiva natural em relação à versão precedente e podem permitir-lhes evadir o sistema imune humano e os fármacos antirretrovirais. Quantas mais forem as cópias ativas do vírus, maior é a possibilidade de se criar uma resistência a fármacos antirretrovirais.

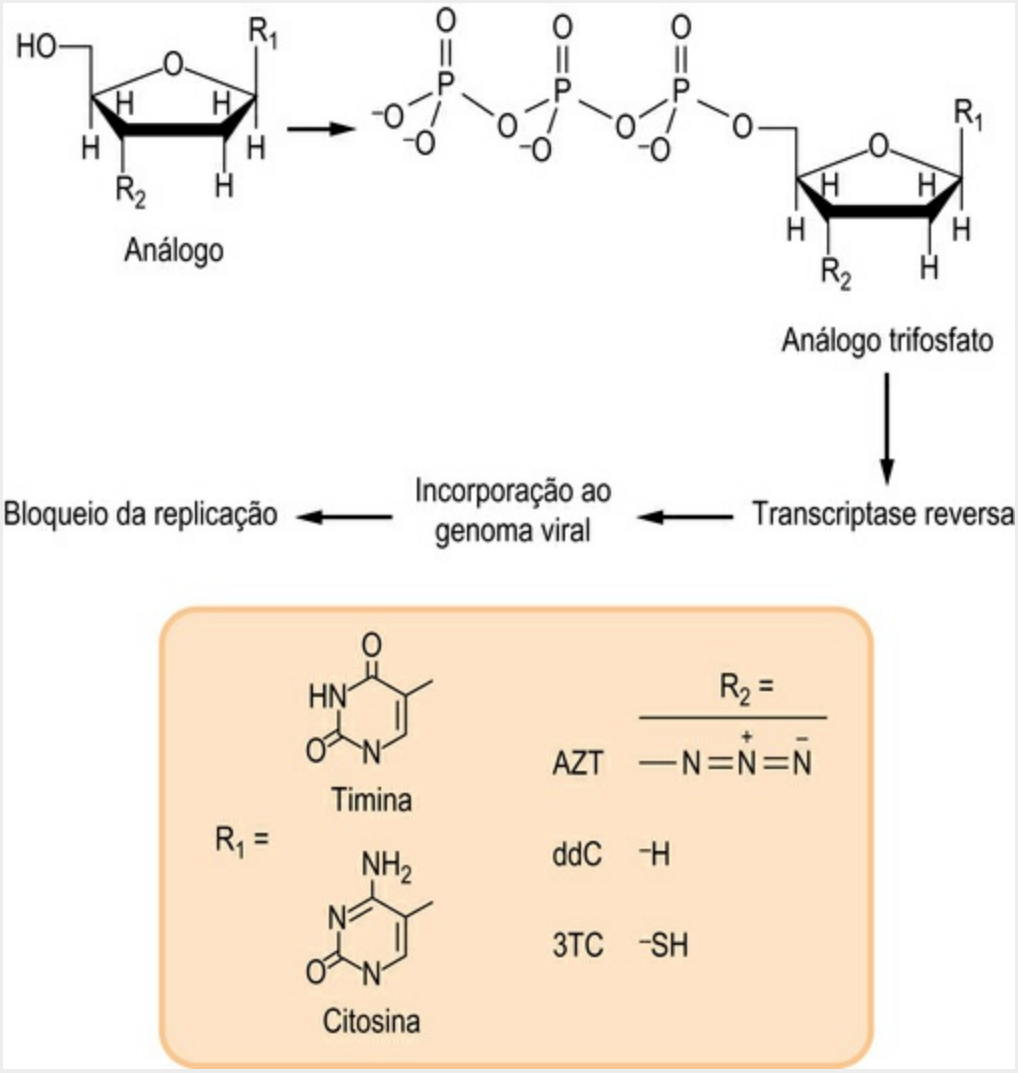


FIG. 32.7 Mecanismo de ação de agentes quimoterápicos antirretrovirais.
Esta classe de inibidores inclui vários compostos com estruturas químicas ligeiramente diferentes na estrutura da nucleobase e na substituição do carbono 3' do anel do açúcar. As estruturas de alguns dos fármacos mais usados são mostradas. Esses compostos são metabolizados em forma trifosfato via metabolismo celular normal (Cap. 30). Os análogos de trifosfatos são, então, incorporados ao genoma viral pela transcriptase reversa. Isto bloqueia a síntese de DNA viral porque a extremidade 3'R_2 modificada da molécula de DNA viral não é substrato para os ciclos posteriores da síntese de DNA. AZT, azido-2',3'-didesoxitimidina; ddC, 2',3'-didesoxicitidina; 3TC, 2',3'-didesoxi-3'-tiacitidina.

Se a terapia antirretroviral for incorretamente empregada, essas estirpes multirresistentes a fármacos podem se tornar os genótipos dominantes muito rapidamente. O uso impróprio em série dos inibidores da transcriptase reversa, como a zidovudina, didanosina, zalcitabina, estavudina e lamivudina, pode resultar em mutações multirresistentes a fármacos.

Reparo do DNA

Ocorrem tipicamente mais de 10.000 modificações do DNA por célula por dia

Como o DNA é o reservatório da informação genética dentro da célula, é importantíssimo manter a sua integridade. Portanto, a célula desenvolveu inúmeros mecanismos altamente eficientes para o reparo de DNA modificado ou danificado.

O DNA pode ser danificado por inúmeros tipos de agentes endógenos e exógenos que causam modificações nos nucleotídios, deleções, inserções, inversões de sequências e transposições. Alguns desses danos são secundários a modificações químicas do DNA por agentes alquilantes (incluindo muitos carcinógenos), espécies reativas de oxigênio (Cap. 37) e radiação ionizante (ultravioleta ou radioativa). Tanto o açúcar quanto as bases de DNA estão sujeitos a modificações, e estima-se que de 10.000 a 100.000 modificações do DNA sejam geradas por célula diariamente. A natureza desses danos é bastante variável, incluindo modificações de bases únicas, quebras de fitas simples ou dupla, e ligação cruzada entre bases ou entre bases e proteínas. O dano oxidativo é provavelmente a forma mais comum de dano ao DNA; ele é aumentado na inflamação, com o fumo, no envelhecimento e em doenças relacionadas à idade, incluindo ateroesclerose, diabetes e doenças neurodegenarativas (Cap. 43). Se não for reparado, o acúmulo de danos levará a alterações permanentes na estrutura do DNA, estabelecendo o estágio de perda das funções celulares, morte celular ou câncer.

Múltiplas vias enzimáticas reparam uma vasta gama de modificações químicas do DNA

Inúmeros agentes químicos e ambientais são conhecidos por produzirem modificações químicas específicas dos nucleotídios na fita de DNA, levando ao pareamento incorreto durante a síntese de DNA. Após a replicação dos cromossomos, a fita filha resultante contém uma sequência de DNA diferente (mutação) da fita parental. As células utilizam o reparo por excisão para remover nucleotídios alquilados e outros análogos de bases incomuns, protegendo, assim, a sequência de DNA de mutações. As fitas não modificadas servem como molde para o processo de reparo.

A luz ultravioleta produz dímeros de timina: reparo por excisão de nucleotídio

Quando a luz ultravioleta (UV) de ondas curtas interage com o DNA, bases de timina adjacentes sofrem uma dimerização incomum, produzindo um dímero de ciclobutiltimina na fita de DNA (Fig. 32.8). O primeiro mecanismo de reparo desses dímeros de timina intrafita é um mecanismo de reparo por excisão. Uma endonuclease, que parece ser específica para este tipo de modificação, cliva a fita que contém o dímero próximo ao dímero de timina, e uma pequena porção desta fita é removida. A DNA polimerase I, a mesma enzima envolvida na biossíntese de DNA, então, reconhece e preenche a lacuna resultante. A DNA ligase completa o reparo pela reunião das fitas de DNA.

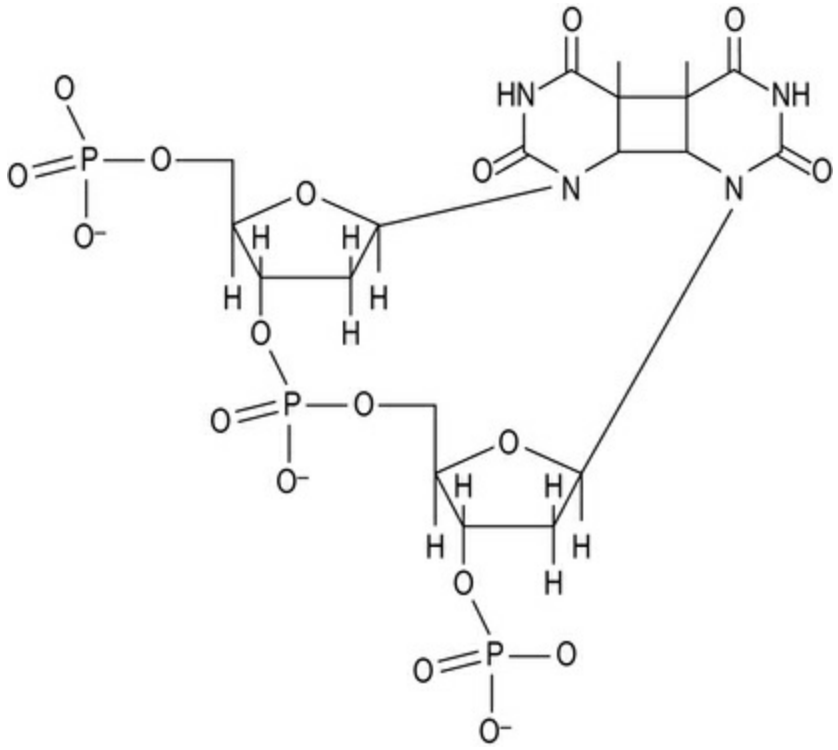


FIG. 32.8 Dímero de timina.
Um dímero de timina consiste em um anel de ciclobutano unindo um par de nucleotídios de timina adjacentes.

Desaminação: reparo por excisão

Os nucleotídios que contêm amina, citosina e adenosina podem desaminar espontaneamente para formar uracila e hipoxantina, respectivamente. Quando essas bases são encontradas no DNA, **N-glicosilases** específicas removem-nas. Isto produz lacunas de pares de bases que são reconhecidas por endonucleases apurínicas ou apirimidínicas específicas que clivam o DNA próximo ao sítio defeituoso. Posteriormente uma exonuclease remove um trecho da fita de DNA contendo o defeito. Uma DNA polimerase de reparo substitui o DNA e, finalmente, uma DNA ligase reúne a fita de DNA. Esse mecanismo de reparo também é denominado reparo por excisão.

Quadro clínico

Xeroderma pigmentosum

O xeroderma pigmentosum (XP) é um grupo de distúrbios autossômicos recessivos raros que coloca em risco a vida do paciente (incidência = 1/250.000) e é caracterizado por extrema sensibilidade à luz solar. Sob exposição à luz solar ou à radiação ultravioleta, surgem na pele de pacientes com XP manchas pontuais pigmentadas, parecidas com sardas. Carcinomas múltiplos e melanomas aparecem precocemente na vida, exacerbados pela exposição ao sol, e a maioria dos pacientes sucumbe ao câncer antes de atingir a idade adulta.

O XP é resultado de um defeito no reparo de dímeros de timina induzidos por UV no DNA. Existem pelo menos oito polipeptídios (genes) envolvidos no reconhecimento,

desenovelamento e reparo por excisão de dímeros de timina induzidos por UV. Pacientes com XP devem evitar luz solar direta, luz fluorescente, luz halógena ou qualquer outra fonte de luz ultravioleta. Uma forma experimental de terapia proteica atualmente sob investigação clínica envolve a aplicação de uma loção cutânea contendo a proteína ou a enzima ausente. De um modo ideal, essa proteína penetrará nas células da pele e estimulará o reparo do DNA danificado por UV. Entretanto, a proteção ocorre somente onde a loção possa ser aplicada. Por exemplo, este tratamento não engloba problemas neurológicos que afetam cerca de 20% dos pacientes com XP.

Depurinação

Alterações de um único par de bases também incluem depurinação. As ligações purina-N-glicosídicas são especialmente instáveis, de forma que se estima que de três a sete purinas são removidas do DNA por minuto por célula. Enzimas específicas reconhecem esses sítios depurinados, e a base é substituída sem interrupção do esqueleto fosfodiéster.

Quebras de fitas

Quebras de fita simples são frequentemente induzidas por radiação ionizante. Estas são reparadas por ligação direta ou por mecanismos de reparo por excisão. Quebras em fita dupla são produzidas por radiação ionizante e alguns agentes quimioterápicos. Por sua vez, as extremidades dupla fita do DNA são raras *in vivo;* elas são encontradas nas extremidades dos cromossomos e em alguns complexos especializados envolvidos no rearranjo de genes. Um sistema enzimático especializado é desenhado para reconhecer e religar essas extremidades, porém se as extremidades estão afastadas umas das outras, o dano não é facilmente reparado.

Reparo de pareamentos incorretos

Erros que escapam da atividade de edição da DNA polimerase III aparecem no DNA recém-sintetizado sob a forma de pareamentos incorretos de nucleotídios. Embora prontamente reparável, a questão crítica é a identificação da fita a ser reparada: qual fita de nucleotídios é a fita filha contendo o erro? Em sistemas bacterianos, o reparo de pareamentos incorretos (*mismatch repair*) é conseguido à custa de metilação pós-replicativa do DNA nos resíduos de adenina, em sequências específicas espaçadas ao longo do genoma; a metilação não afeta o pareamento de bases. As fitas recém-sintetizadas não apresentam resíduos de adenina metilados, de forma que as enzimas do sistema de reparo de pareamentos incorretos exploram o DNA, identificam o pareamento incorreto e, então, reparam a fita não metilada com o reparo por excisão. Uma abordagem similar é utilizada para corrigir pareamentos incorretos que ocorrem durante a síntese do DNA de mamíferos. Defeitos no reparo de pareamentos incorretos estão associados ao câncer de cólon não polipose hereditário, uma condição autossômica dominante em humanos.

8-oxo-2′-desoxiguanosina

Mais de 20 modificações oxidativas diferentes do DNA foram caracterizadas; a mais estudada é a 8-oxo-2′-desoxiguanosina (8-oxoG) (Fig. 32.9). Durante o processo de replicação do DNA, pareamentos incorretos entre o nucleosídio modificado 8-oxoG na fita molde e o nucleotídio trifosfato seguinte resultam na transversão G para T, introduzindo, assim, mutações na fita de DNA. Embora mecanismos de reparo por excisão sejam eficazes, a 8-oxoG, tal qual outras bases modificadas, pode ser reincorporada ao DNA após a excisão.

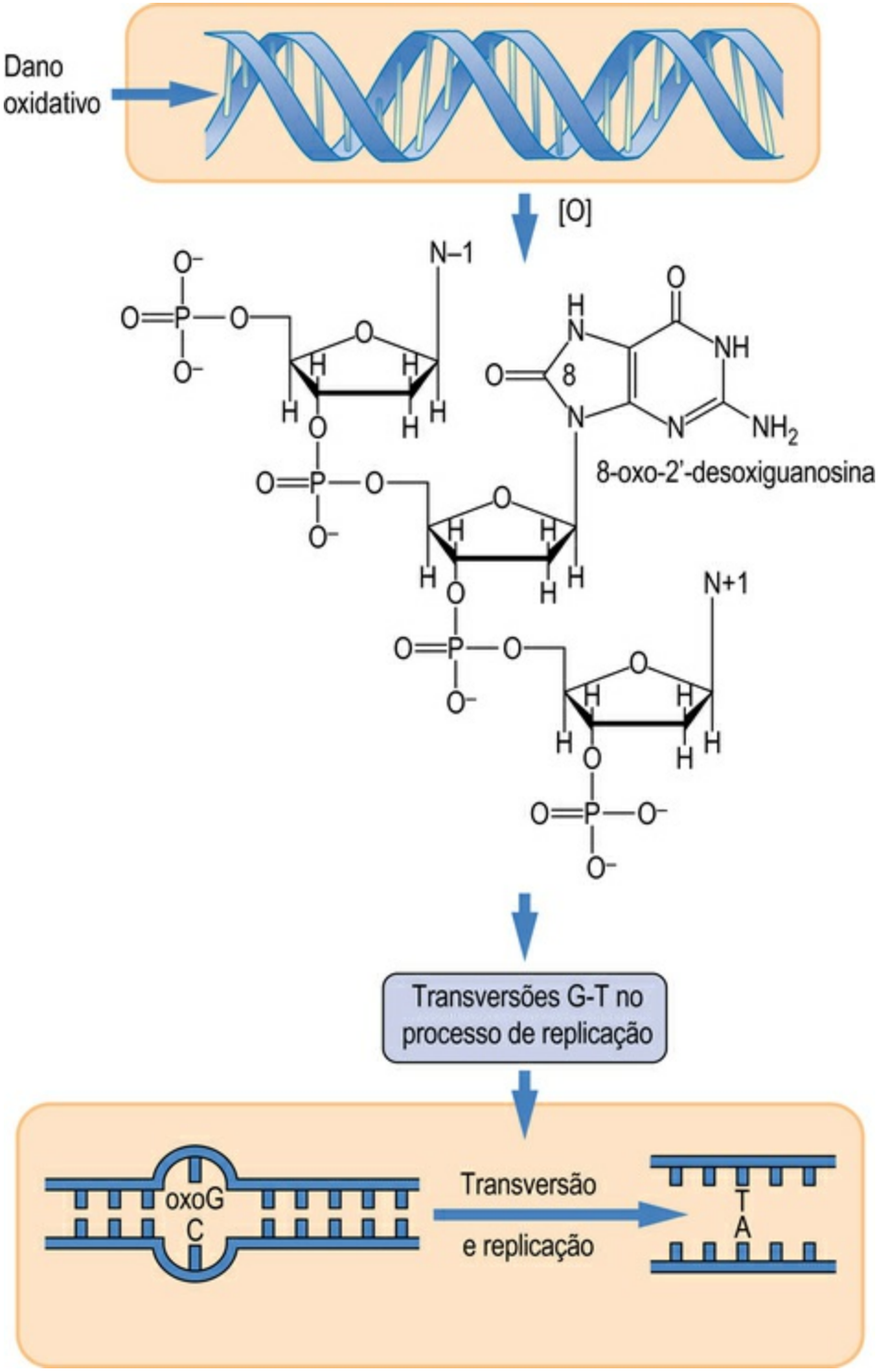


FIG. 32.9 Dano oxidativo ao DNA.
A 8-oxo-2'-desoxiguanosina (oxoG) é uma modificação oxidativa do DNA que causa mutações durante a replicação do DNA. A replicação da fita contendo oxoG frequentemente gera uma pirimidina A na fita complementar que, nas replicações posteriores, gera um par de bases AT em vez do par de bases GC original.

Quadro de teste clínico

Teste de ames para mutagênicos

Mutagênicos são compostos químicos que induzem mudanças na sequência de DNA. Um grande número de agentes químicos naturais e artificiais é mutagênico. Para

avaliar o potencial de mutação do DNA, o bioquímico americano Bruce Ames desenvolveu um teste simples, usando linhagens especiais de *Salmonella typhimurium* que não podem crescer na ausência de histidina (fenótipo His^-). Essas linhagens auxotróficas para histidina contêm substituições de nucleotídios ou deleções que impedem a produção de enzimas da biossíntese de histidina.

Para testar quanto à mutagênese, as bactérias mutantes são semeadas em um meio de cultura na ausência de histidina; o mutagênico em teste é adicionado ao meio. A ação do mutagênico ocasionalmente resulta na reversão da mutação da histidina, gerando uma linhagem reversa que pode agora sintetizar histidina e crescerá na sua ausência. A mutagenicidade de um composto é medida pela contagem do número de colônias que cresceram, ou seja, reverteram para o fenótipo His^+. Há uma boa correlação entre os resultados do teste de mutagenicidade de Ames e testes diretos de atividade carcinogênica em animais.

Alguns agentes químicos **(pró-carcinógenos)** não são mutagênicos *per se*, mas são ativados para compostos mutagênicos durante os processos metabólicos, por exemplo, durante a desintoxicação de fármacos no fígado ou nos rins. O benzopireno, por exemplo, não é mutagênico, mas durante sua desintoxicação no fígado é convertido em diolepóxidos, que são potentes mutagênicos e carcinógenos. Para fornecer sensibilidade de detecção de pró-carcinógenos o meio de cultura para o teste de Ames é suplementado com um extrato microssomal de fígado, uma subfração de tecido rica em retículo endoplasmático liso contendo enzimas metabolizadoras de fármacos.

Recentemente, uma proteína de mamífero, a MTH1, foi caracterizada por degradar especificamente a 8-oxo-dGTP, prevenindo, portanto, a incorporação errada deste nucleotídio alterado no DNA. A terapia gênica foi utilizada para desenvolver um camundongo *knockout* para MTH1. Comparado com o animal selvagem, o *knockout* apresentou um número maior de tumores no pulmão, fígado e estômago, ilustrando a importância deste (e de outros) mecanismos de proteção pós-reparo.

Em células de pulmão, a inalação de alguns materiais particulados resulta em aumento dos níveis de 8-oxoG. O processo inflamatório pode desempenhar uma função na formação de tumores de pulmão induzida por asbestos. O tabagismo também induz dano oxidativo e aumenta os níveis de produtos de oxidação do DNA nos pulmões, sangue e urina. A 8-oxo-2′-desoxiguanosina é eliminada por filtração renal. Assim, seu nível urinário é usado como um biomarcador sensível do estresse oxidativo em muitos estudos clínicos (Cap. 43). Um novo analisador automático de imunocromatografia, que mede a 8-oxodG urinária, pode ser usado como teste de cabeceira para a avaliação do estresse oxidativo.



Quadro clínico

Notícias do tratamento do câncer: dois novos alvos proteicos para

contrariar as "recidivas" e a "resistência a fármacos"

Os atuais tratamentos para o câncer, como a radiação ionizante e a quimioterapia, têm o DNA como alvo. Sua fundamentação é clara: esses tratamentos afetam o genoma, e um equilíbrio entre prevenir a divisão e proliferação das células tumorais e não danificar irreversivelmente os tecidos saudáveis se impõe. No entanto, as células tumorais dispõem de um vasto conjunto de mecanismos de reparo de DNA para limitar a lesão. Por esse motivo, os sistemas de reparo de DNA são alvos de terapia adjuvante usada para acentuar a sensibilidade das células tumorais a agentes direcionados para o DNA. O reparo de excisão de bases e o reparo de excisão de nucleotídios são mecanismos-chave de reparo do DNA. Existem dois alvos proteicos associados aos fenômenos de "recidiva" e "resistência a fármacos", imagens de marca da quimioterapia: Grupo de Complementação Cruzada de Reparo de Excisão 1 (ERCC1) e a DNA polimerase beta. O primeiro é um interveniente-chave no reparo de excisão de nucleotídios; a segunda é a polimerase suscetível a erros do reparo de excisão de bases. Apenas alguns inibidores ERCC1 foram descobertos, mas mais de 60 o foram para a DNA polimerase beta. A descoberta de inibidores potentes e específicos de tumores destas enzimas deverá melhorar as atuais terapias em que se desenvolve resistência, incluindo a bleomicina, agentes alquilantes e a cisplatina.

Resumo

- O genoma humano é composto de DNA, um polímero de desoxirribonucleotídios, antiparalelo e dupla fita helicoidal, estabilizado por pontes de hidrogênio entre as bases complementares.
- O DNA está empacotado no cromossomo em uma estrutura condensada altamente organizada, conhecida como cromatina.
- A informação genética é replicada por um mecanismo semiconservativo, no qual as fitas parentais são separadas e ambas servem como moldes para o DNA filho.
- A replicação do DNA é um processo complexo e rigorosamente regulado. O DNA é essencialmente o único polímero no organismo que é preferencialmente reparado, em lugar de ser degradado, por meio de modificações químicas e biológicas. Os mecanismos de reparo geralmente envolvem excisão de bases modificadas e substituição, usando a fita não modificada como molde.

Questões para aprendizagem

1. Quais são as possíveis funções de formas incomuns de DNA?
2. Discuta as possíveis funções das sequências moderadamente e altamente repetitivas do DNA.
3. O câncer de cólon não polipose hereditário resulta de um defeito no mecanismo de reparo de pareamentos incorretos. Por que essa condição é autossômica dominante?
4. Quais são as diferenças na replicação e no reparo entre o DNA nuclear e o DNA

mitocondrial?

Leituras sugeridas

Frias, C., Pampalona, J., Genesca, A., et al. Telomere dysfunction and genome instability. *Front Biosci*. 2012; 17:2181–2196.

Kaneko, K., Kimata, T., Tsuji, S., et al. Measurement of urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2-deoxyguanosine in a novel point-of-care testing device to assess oxidative stress in children. *Clin Chim Acta*. 2012; 413:1822–1826.

Ruemmele, F. M., Garnier-Lengline, H. Why are genetics important for nutrition? Lessons from epigenetic research. *Ann Nutr Metab*. 2012; 60(Suppl 3):38–43.

Slijepcevic, P. DNA damage response, telomere maintenance and ageing in light of the integrative model. *Mech Ageing Dev*. 2008; 129:11–16.

Spry, M., Scott, T., Pierce, H., et al. DNA repair pathways and hereditary cancer susceptibility syndromes. *Front Biosci*. 2007; 12:4191–4207.

Travers, A. A., Muskhelishvili, G., Thompson, J. M. DNA information: from digital code to analogue structure. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci*. 2012; 370:2960–2986.

Venter, J. C. Genome sequencing anniversary: the human genome at 10 – successes and challenges. *Science*. 2011; 331:546–547.

Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W. The sequence of the human genome. *Science*. 2001; 291:1304–1351.

Watson, J. D. *The double helix: a personal account of the discovery of the structure of DNA*. New York: WW Norton; 1980.

Watson, J. D. *A passion for DNA. Genes, genomes and society*. Oxford: Oxford University Press; 2000.

Sites

DNA interactive: www.dnai.org. This is the best introduction to the subject.

DNA replication: http://www.freesciencelectures.com/video/dna-replication-process/

DNA workshop: www.pbs.org/wgbh/aso/tryit/dna

Graphics: www.accessexcellence.org/AB/GG/structure.html

Mitochondrial DNA: www.mitomap.org

National Human Genome Research Institute: www.genome.gov

CAPÍTULO 33

Ácido Ribonucleico

Gary A. Bannon and Robert Thornburg

Objetivos

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Identificar os principais tipos de RNA celular e a função de cada um deles.
- Descrever as principais etapas da transcrição de uma molécula de RNA.
- Explicar a função das diferentes RNA polimerases.
- Descrever as principais diferenças entre mRNAs procarióticos e eucarióticos.
- Descrever os diferentes eventos de processamento e *splicing* que ocorrem durante a síntese de mRNAs eucarióticos.

Introdução

A transcrição é definida como a síntese de uma molécula de ácido ribonucleico (RNA) utilizando uma molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA) como molde

A transcrição é uma série de processos enzimáticos complexos que resultam na transferência da informação genética armazenada no DNA de fita dupla para uma molécula de RNA de fita simples que será utilizada pela célula para direcionar a síntese de suas proteínas, um processo conhecido como tradução. Existem três classes gerais de moléculas de RNA encontradas em células procarióticas e eucarióticas: RNA ribossomal (rRNA), RNA de transferência (tRNA) e RNA mensageiro (mRNA). Cada classe apresenta funções e tamanhos distintos (Tabela 33.1), descritos por suas taxas de sedimentação em uma ultracentrífuga (S, unidades de Svedberg) ou pelo seu número de bases (nt, nucleotídio, ou kb, quilobase). Os procariotos possuem as mesmas três classes gerais de RNA dos eucariotos, mas os tamanhos e as características estruturais são diferentes:

Tabela 33.1

Classes gerais de RNA

RNA	Tamanho e comprimento	Percentual de RNA celular total	Função
rRNA	28 S, 18 S, 5.8 S, 5 S (23 S, 16 S, 5 S)*	80	Interagir para formar ribossomos
tRNA	65-110 nt	15	Adaptador
mRNA	0,5-6+ kb	5	Direcionar a síntese de proteínas celulares

*Tamanho do rRNA em células procarióticas. nt, nucleotídio; kb, quilobase; S, unidade de Svedberg.

- **RNA ribossomal (rRNA)** de procariotos consiste em três tamanhos diferentes de RNA, enquanto rRNA de eucariotos consiste em quatro tamanhos diferentes de RNA. Esses RNAs interagem uns com os outros e com proteínas para formar um ribossomo, que constitui a maquinaria básica na qual ocorre a síntese de proteínas.
- **RNAs de transferência (tRNAs)** consiste em uma classe de tamanho de RNA, com 65-110 nt de comprimento; eles funcionam como carreadores de aminoácidos e como moléculas de reconhecimento que identificam a sequência de nucleotídios do mRNA e a traduzem na sequência de aminoácidos das proteínas
- **RNAs mensageiros (mRNAs)** representam a classe mais heterogênea de RNAs encontrada nas células. Os mRNAs geralmente variam em tamanho de 500 nt a quase 6 kb (alguns mRNAs raros, porém importantes, são >100 kb). Os mRNAs são carreadores da informação genética, definindo a sequência de todas as proteínas da célula; eles são as "cópias funcionais" do genoma.

Para se compreender a série complexa de eventos que leva à produção dessas três classes de RNA, este capítulo é dividido em cinco partes. A primeira parte descreve a anatomia molecular dos principais tipos de RNA encontrados em células procarióticas e eucarióticas; pela compreensão da natureza química dos produtos finais da transcrição, você estará mais preparado para entender as etapas envolvidas na geração dessas moléculas. A segunda parte descreve as principais enzimas envolvidas na transcrição e suas especificidades. A terceira parte descreve as três etapas (iniciação, alongamento e terminação) necessárias para se produzir uma proteína. Na quarta parte, as modificações que são feitas aos produtos primários da transcrição (processamento pós-transcricional) são descritas. Essa informação se econtra mais detalhada no Capítulo 34. A quinta parte descreve resumidamente como as células regulam a expressão gênica ao nível de RNA.

Anatomia molecular de moléculas de ácido ribonucleico

Ao contrário do DNA, os RNAs são maioritariamente de cadeia simples e contêm uracila em vez de timina

Em geral, os RNAs produzidos pelas células procarióticas e eucarióticas são moléculas de ácido nucleico de cadeia simples que consistem em nucleotídios de adenina, guanina, citosina e uracila, ligados entre si por ligações fosfodiéster. O início de uma molécula de RNA é conhecido como sua extremidade 5′, e a terminação do RNA é sua extremidade 3′.

Embora a maioria dos RNAs seja de cadeia simples, eles se dobram sobre si próprios. Portanto, eles apresentam uma extensa estrutura secundária, incluindo regiões de dupla fita intramoleculares que são importantes para sua função. Essas estruturas secundárias, uma das mais comuns é chamada **alça em grampo** (*hairpin loop*) (Fig. 33.1), são o produto de pareamentos intramoleculares de bases que ocorrem entre nucleotídios complementares dentro de uma única molécula de RNA.

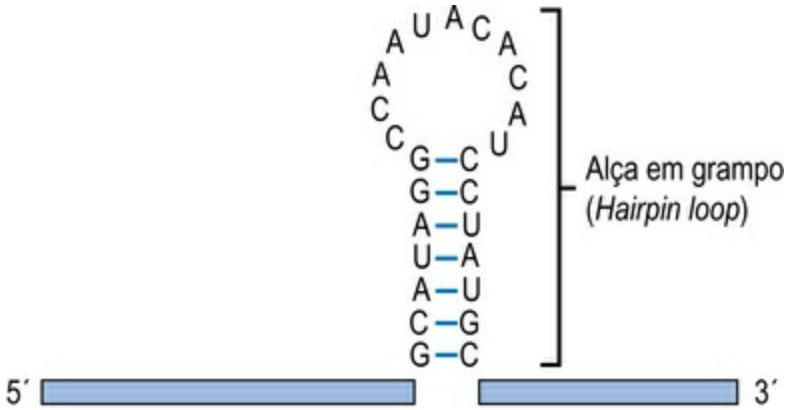


FIG. 33.1 Alça em grampo do RNA (*Hairpin loop*).
O RNA pode formar estruturas secundárias chamadas alças em grampo (*hairpin loops*). Essas estruturas são formadas quando bases complementares dentro de um RNA individual compartilham pontes de hidrogênio e formam pares de bases. Alças em grampo são conhecidas por sua importância na regulação da transcrição tanto em células eucarióticas quanto em células procarióticas.

rRNAs: os RNAs ribossomais

Os rRNAs eucarióticos inicialmente são sintetizados como um único transcrito de RNA com um tamanho de 45 S e cerca de 13 kb de comprimento. Esse longo transcrito primário é processado nos rRNAs 28S, 18S, 5,8S e 5S (aproximadamente 3 kb, 1,5 kb, 160 e 120 nt, respectivamente). Os rRNAs 28S, 5,8S e 5S se associam a proteínas para formar a subunidade maior do ribossomo. O rRNA 18S se associa a proteínas ribossomais diferentes para formar a subunidade menor do ribossomo. A subunidade maior do ribossomo com suas proteínas e RNAs possui um tamanho característico de 60 S; a subunidade menor tem um tamanho de 40 S. Essas duas subunidades interagem para formar um ribossomo 80S funcional (Cap. 34). Os rRNAs procarióticos interagem de modo similar para formar essas subunidades ribossomais, porém possuem um tamanho um pouco menor, refletindo a diferença entre os tamanhos dos transcritos dos rRNAs de procariotos e eucariotos (Tabela 33.2).

Tabela 33.2

rRNAs e ribossomos

Tipo de célula	rRNA	Subunidade	Tamanho	Ribossomo intacto
Procarioto	23 S, 5 S	Maior	50 S	70 S
	16 S	Menor	30 S	
Eucarioto	28 S, 5,8 S, 5 S	Maior	60 S	80 S
	18 S	Menor	40 S	

Os rRNAs interagem para formar os ribossomos.

tRNA: o trevo de quatro folhas molecular

Os tRNAs procarióticos e eucarióticos são similares tanto em tamanho quanto em estrutura. Eles apresentam extensa estrutura secundária e contêm vários **ribonucleotídios modificados** derivados dos quatro nucleotídios normais. Todos os tRNAs possuem uma dobra similar, com quatro alças distintas que foram descritas como **trevo de quatro folhas** (Fig. 33.2). A alça D contém várias bases modificadas, incluindo citosinas metiladas e di-hidrouridina (D), que conferiu o nome à alça. A **alça do anticódon** é a estrutura responsável pelo reconhecimento do códon complementar de uma molécula de mRNA; interação específica de um anticódon do tRNA com o códon apropriado do mRNA ocorre devido ao pareamento das bases entre essas duas sequências de trinucleotídios complementares. Uma alça variável, de 3 a 21 nt de comprimento, existe na maioria dos tRNAs, mas sua função é desconhecida. Finalmente, existe uma alça TψC, que contém uma base modificada, a pseudouridina (ψ). Outra estrutura de destaque encontrada em todas as moléculas de tRNA é a **haste aceptora.** Essa estrutura é formada pelo pareamento de bases entre os nucleotídios de cada uma das extremidades do tRNA. As últimas três bases encontradas na extremidade 3′ permanecem não pareadas, e sempre apresentam a mesma sequência: 5′-CCA-3′. Esta extremidade 3′ da haste aceptora é o ponto no qual um aminoácido é adicionado via uma ligação éster entre o grupamento 3′-hidroxila da adenosina e o grupamento carboxila de um aminoácido durante a síntese de proteínas (Cap. 34).

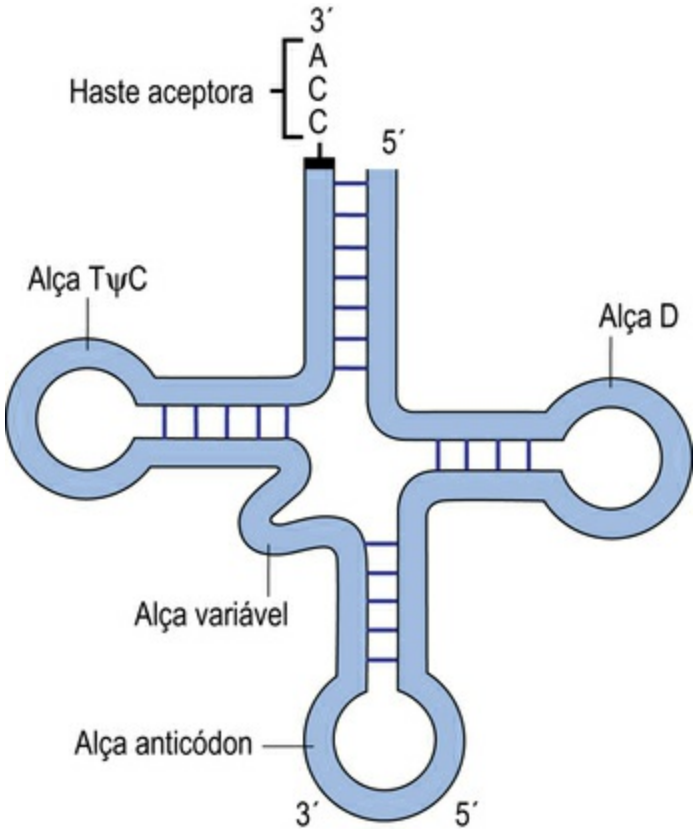


FIG. 33.2 A estrutura de uma molécula de tRNA.
Um protótipo de molécula de tRNA é mostrado, e as estruturas importantes para sua função estão indicadas. A estrutura geral da molécula deve-se ao pareamento de bases complementares entre nucleotídios dentro de um único RNA. Todos os tRNAs apresentam essa estrutura básica.

mRNA: procariotos e eucariotos possuem mRNAs diferentes

Procariotos e eucariotos são tipos de organismos muito diferentes com ciclos de vida bastante peculiares. Portanto, não é surpresa nenhuma que existam diferenças entre as estruturas de seus genes, seus mecanismos de transcrição e as estruturas de seus mRNAs. Na verdade, podemos explorar essas diferenças com novos antibióticos que possuem como alvo etapas únicas do ciclo de vida de procariotos. Existe um grande número de diferenças importantes entre os mRNAs eucarióticos e procarióticos. Estas serão discutidas nas seções adiante. Resumidamente, essas diferenças são:

- As unidades transcricionais são estruturalmente diferentes: os mRNAs de procariotos são policistrônicos enquanto os mRNAs de eucariotos são monocistrônicos (Fig. 33.3).

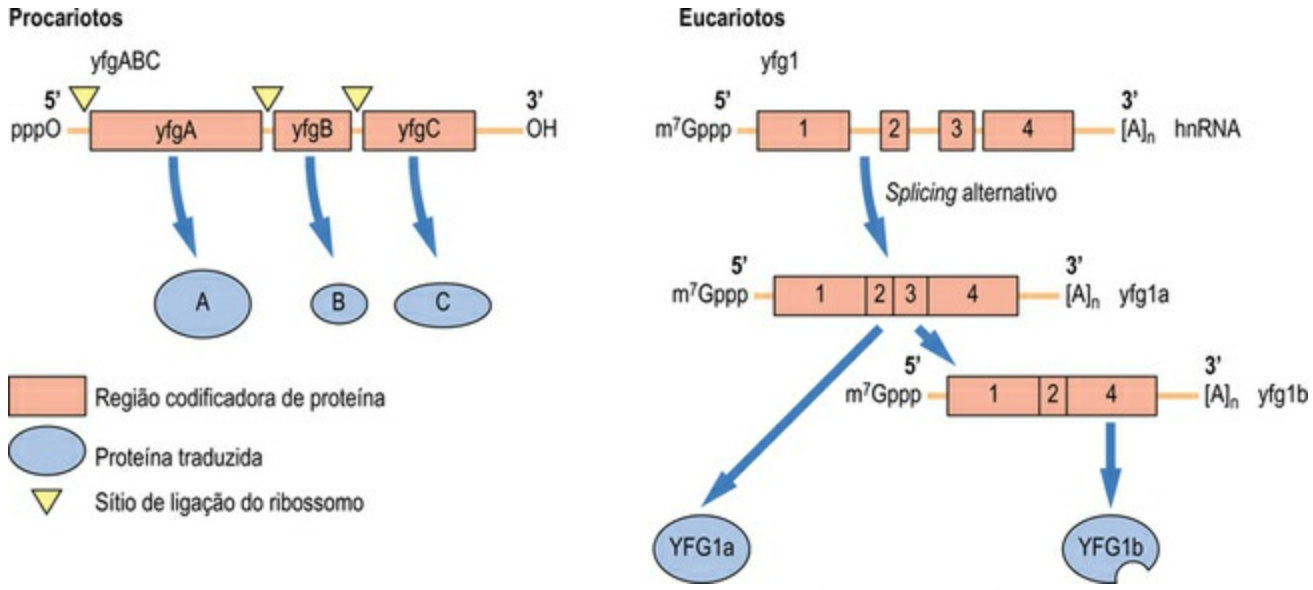


FIG. 33.3 Protótipos das estruturas de mRNAs procarióticos (policistrônico) e eucarióticos. Os mRNAs procarióticos possuem extremidades desprotegidas (trifosfato na extremidade 5' e hidroxila na extremidade 3'). As caixas indicam as porções do mRNA que codificam uma proteína. Os triângulos invertidos indicam a localização dos sítios de ligação de ribossomos. Os três genes neste cístron são traduzidos em três diferentes proteínas. Outros cístrons procarióticos podem codificar até dez proteínas diferentes em um único mRNA. Os transcritos nascentes de mRNA eucariótico **(RNA nuclear heterogêneo [hnRNA])** contêm tanto os éxons (caixas) quanto os íntrons (linhas). Os mRNAs eucarióticos são protegidos por um cap do nucleotídio 7-metilguanina (m^7Gppp), na extremidade 5', e uma cauda poli A ($[A]_n$), na extremidade 3'. Após *splicing*, os mRNAs maduros consistem somente em éxons mais as UTRs 5' e 3'. Os mRNAs que sofreram *splicing* alternativo são traduzidos em isoformas diferentes de proteínas. *ygf:* seu gene favorito; UTR: região não traduzida.

- Compartimentalização da transcrição e da tradução: os procariotos sintetizam RNA e proteínas em um único compartimento, o citoplasma celular, os eucariotos separam esses eventos no núcleo e no citoplasma.
- Proteção de suas extremidades 5′ e 3′: as extremidades dos mRNAs de procariotos são descobertas, e os mRNAs de eucariotos possuem uma proteção (*cap*) e uma cauda poli (A).
- Processamento de mRNAs: os mRNAs de procariotos não são processados; os mRNAs de eucariotos contêm íntrons que são retirados durante o processo.

A principal diferença entre os mRNAs de procariotos e eucariotos é em relação à estrutura de sua unidade transcricional. Em procariotos, as unidades transcricionais geralmente contêm múltiplas regiões codificadoras de proteínas (Fig. 33.3), enquanto em eucariotos cada unidade transcricional geralmente codifica somente uma única proteína. Os **mRNAs policistrônicos** de procariotos possuem códons individuais de iniciação e de parada no início e no final de cada fase de leitura aberta, ou seja, a sequência de mRNA que especifica a sequência da cadeia polipeptídica. Cada códon de parada é imediatamente seguido por outro sítio de ligação de ribossomo e um sítio de iniciação de tradução que funciona para a próxima fase de leitura aberta.

A segunda principal diferença entre os mRNAs procarióticos e eucarióticos é a compartimentalização dos processos de transcrição e tradução. Como os procariotos não possuem um núcleo, a transcrição e a tradução estão intimamente acopladas no citoplasma; a tradução procariótica geralmente se inicia antes do término do processo de

transcrição. Em razão do acoplamento desses processos, os procariotos aumentam a taxa de expressão de proteínas, de maneira compatível com o tempo de vida relativamente curto desses organismos. Em contrapartida, as células eucarióticas separam a transcrição no núcleo da tradução no citoplasma. Embora esse arranjo atrase o tempo de resposta para a produção de uma proteína, ele permite um controle muito mais sutil de sua expressão.

O processamento pós-transcricional dos mRNAs é também significativamente diferente em procariotos e eucariotos. Devido à sua importância, essas diferenças serão descritas em uma seção separada mais adiante, em que se abordará o processamento pós- transcricional de RNAs. Resumidamente, os eucariotos protegem as extremidades 5′ e 3′ dos mRNAs pela adição de estruturas moleculares específicas **(cap 5′ e cauda poli A)** que têm como função reduzir a renovação *(turnover)* de mRNA. Além disso, os genes eucarióticos contêm íntrons, sequências não traduzidas que estão presentes em transcritos nascentes e devem ser retiradas para produção de mRNAs maduros.

Polimerases de ácido ribonucleico

As RNAs polimerases são enzimas multiméricas grandes que transcrevem segmentos definidos do DNA em RNA com um alto grau de seletividade e especificidade

As enzimas responsáveis pela síntese de RNA são denominadas RNA polimerases (RNAPol). Ao contrário das DNAs polimerases (Cap. 32), as RNA polimerases não requerem um iniciador para iniciar a síntese de RNA. As RNAs polimerases geralmente consistem em duas subunidades de alto peso molecular e várias subunidades menores, todas as quais são necessárias para uma transcrição precisa. Os procariotos contêm uma única RNA polimerase que sintetiza todos os RNAs; entretanto, os eucariotos contêm três RNAs polimerases diferentes, denominadas RNAs polimerases I, II e III.

Cada polimerase é especializada na transcrição de uma classe de RNA

- A RNAPol I transcreve RNAs ribossomais. Nas células eucarióticas, os rRNAs são produzidos de uma única unidade transcricional que é posteriormente processada para produzir os rRNAs 18S, 28S, 5,8S e 5S.
- A RNAPol II transcreve a maioria dos outros genes dentro de uma célula eucariótica, incluindo todos os genes codificadores de proteínas que geram mRNA. A RNAPol II é bastante sensível à α-amanitina, um inibidor de transcrição potente e tóxico encontrado em alguns cogumelos venenosos.
- A RNAPol III transcreve a maioria dos pequenos RNAs celulares, incluindo os tRNAs.

A RNAPol II de leveduras consiste em um núcleo de 12 subunidades. Ela existe sob duas formas. A primeira é uma forma aberta que se parece com uma mão fechada com uma fenda, que liga a molécula de DNA e os fatores de transcrição associados perto do ponto de início da transcrição. Após a desnaturação ou dissociação das fitas de DNA ligado, o complexo sofre uma grande mudança conformacional que fecha a fenda,

formando um grampo em torno da fita **antissenso** ou molde do DNA. Posteriormente, uma proteína específica *(rbp4/7)* se liga à base do grampo, trancando-o em um estado fechado. Essa forma fechada não é mais eficaz para o início da transcrição, mas é capaz de realizar o alongamento. A estrutura da RNAPol II de leveduras parece ser um excelente modelo para a enzima humana. Além disso, também é um bom modelo para as funções das RNAPol I e III, porque as subunidades do núcleo são compartilhadas ou homólogas entre as várias enzimas.

A RNA polimerase de bactérias é similar ao complexo enzimático eucariótico, exceto que a enzima bacteriana contém somente quatro subunidades ($\alpha_2\beta\beta'$) e que, ao contrário da enzima eucariótica, requer somente um único fator de transcrição geral (fator σ) para reconhecer o promotor e recrutar a RNA polimerase para iniciar a transcrição.

Ácido ribonucleico mensageiro: transcrição

A transcrição é um processo dinâmico que envolve a interação específica de enzimas com o DNA para produzir moléculas de RNA

É conveniente dividir a transcrição em três estágios separados: iniciação, elongação e terminação. A transcrição prossegue ao longo da fita antissenso ou molde, produzindo um **RNA complementar** que é idêntico à fita senso do DNA (Fig. 33.4), excetuando que os resíduos de timina no DNA são substituídos por resíduos de uracila no RNA.

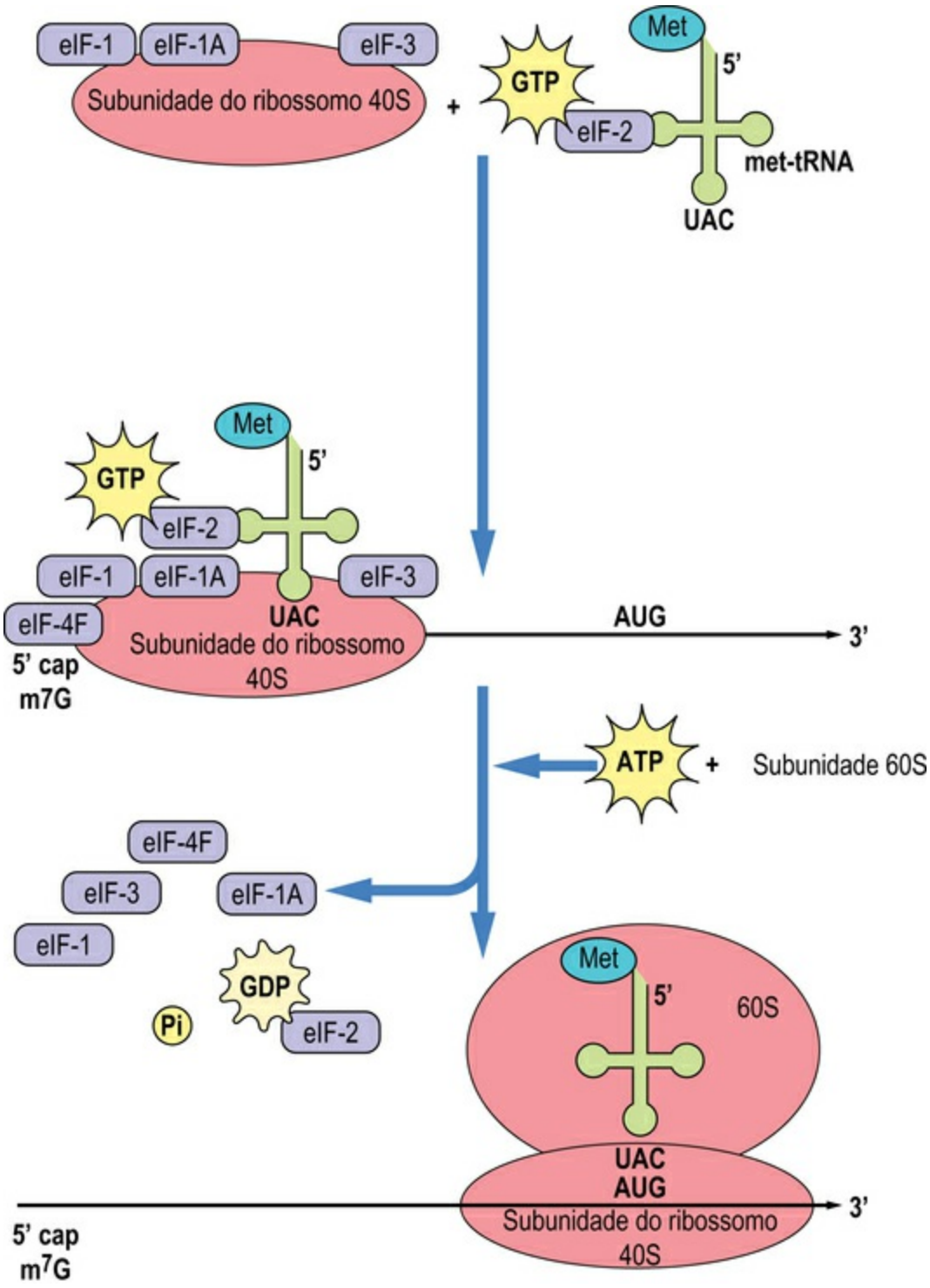


FIG. 33.4 Transcrição.
A transcrição envolve a síntese de RNA pela RNA polimerase utilizando DNA como molde. A holoenzima RNA polimerase utiliza a fita antissenso do DNA para direcionar a síntese de uma molécula de RNA que é complementar a essa fita.

Quadro clínico

Envenenamento por α-amanitina: colhendo o cogumelo errado

Uma mulher jovem e saudável se apresenta à sala de emergência, de manhã cedo, com náusea intensa, cólica abdominal e diarreia abundante. Os sinais vitais da paciente indicam taquicardia e sua pele apresenta menor turgidez, o que indica

desidratação. Enquanto relata seu histórico médico, a paciente explica que seus sintomas começaram repentinamente, cerca de seis horas após ter jantado. Ante a suspeita de envenenamento alimentar, é pedido para a paciente relatar tudo o que ela havia comido nas últimas 24 horas. A paciente relata que comeu cogumelos no jantar e que estes foram colhidos em uma recente caminhada na floresta. O tratamento da paciente se inicia com salina e eletrólitos, para prover os fluidos perdidos, e também é dado carvão ativado, para absorver qualquer resíduo ou toxina residual circulante no trato gastrintestinal. A paciente parece se estabilizar nas 24 horas seguintes e está alerta; entretanto, permanece letárgica e sua pele começa a apresentar uma coloração amarelada. Os exames de sangue mostram glicose sanguínea reduzida, aminotransferase sérica elevada e tempo de protrombina aumentado. Os níveis de amilase e lipase estão normais, indicando não haver qualquer envolvimento do pâncreas, e a análise da urina não indica comprometimento renal. O médico consulta um gastroenterologista, que aconselha maior monitoramento da função hepatorrenal e prolongamento do tratamento com fluidos e eletrólitos intravenosos. Após aproximadamente cinco dias, a paciente se recupera. Qual é a base bioquímica da doença dessa mulher?

Comentário

Cerca de 95% de todas as fatalidades causadas por cogumelos na América do Norte estão associadas à ingestão das espécies *Amanita*. Essas espécies produzem uma toxina, a α-amanitina, que se liga à RNAPol II e inibe sua função. As primeiras células a encontrarem a toxinas são as presentes no trato digestivo. Células incapazes de sintetizar novos mRNAs morrem, causando um estresse gastrintestinal agudo. A falência hepática é uma complicação séria da ingestão de α-amanitina, devido à indução da apoptose nas células hepáticas pela amanitina. Icterícia e testes da função hepática (transaminase, fosfatase alcalina, bilirrubina, níveis de aminotransferases e tempo de protrombina) indicam o nível de envolvimento do fígado (Cap. 30). A maioria das exposições acidentais a cogumelos ocorre em crianças com idade inferior a 6 anos que, por causa do tamanho, absorvem uma dose maior de toxina por kg de peso corporal. Em um adulto, a ingestão de um único cogumelo *Amanita phalloides* pode ser fatal. As taxas de mortalidade variam de 10 a 20% de todos os pacientes. Não existe um antídoto específico para a amatoxina, embora a administração de elevadas doses de penicilina G desloque a amanitina das proteínas plasmáticas circulantes, promovendo dessa forma sua excreção.

Iniciação

A iniciação envolve a interação específica do sítio da RNA polimerase com o DNA

Como a maior parte do DNA genômico não codifica proteínas, a identificação de sítios de início da transcrição é crucial para se obter os mRNAs desejados. Sequências especiais denominadas promotores recrutam a RNA polimerase para o sítio de início da transcrição (Fig. 33.5). Os promotores estão comumente localizados na frente (*upstream*)

do gene a ser transcrito. Entretanto, os promotores da RNA polimerase III estão presentes, na verdade, dentro do gene.

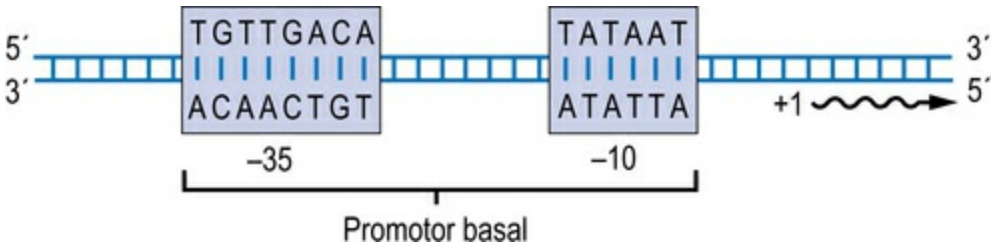


FIG. 33.5 Promotores procarióticos.
Os promotores dos genes procarióticos estão localizados imediatamente acima do ponto de início da transcrição. Duas regiões conservadas comuns foram identificadas e são encontradas nas posições –35 e –10, respectivamente. As sequências consenso dessas regiões estão indicadas. A posição +1 indica o primeiro nucleotídio que será transcrito em RNA. O TATA box a –10 é um elemento promotor comum rico em AT.

Em geral, os genes procarióticos contêm promotores simples. Os promotores são usualmente ricos em adenina (A) e timina (T). A presença desses nucleotídios facilita a separação das duas fitas do DNA, porque as pontes de hidrogênio entre os pares de bases A-T são mais fracas do que entre os pares de bases G-C. As comparações entre inúmeros promotores procarióticos identificaram duas regiões conservadas comuns. Elas estão localizadas a quase 10 e 35 nucleotídios acima (sequências –10 e –35, respectivamente) do sítio de início da transcrição (Fig. 33.5). A sequência –10 é conhecida como **TATA box.** Essa sequência se liga ao fator geral de transcrição procariótico (fator σ), que interage e recruta a RNA polimerase para o promotor. Promotores fortes tendem a se assemelhar à sequência consenso mostrada na Figura 33.5; sequências de promotores mais fracos diferem da sequência consenso, e a ligação com o fator σ e a RNA polimerase é menos forte.

Nos promotores eucarióticos da RNAPol II, **elementos regulatórios** (sequências curtas e específicas de DNA), denominados sequências de ativação *upstream* (UASes), acentuadores (*enhancers*), repressores, sequências CAATT e TATA box, estão espalhados por várias centenas a vários milhares de nucleotídios. Fatores de transcrição individuais (ativadores ou repressores) reconhecem e se ligam a essas UASes. O controle da iniciação e a regulação da expressão gênica se encontram detalhados no Capítulo 34.

Alongamento

A elongação é o processo pelo qual nucleotídios únicos são adicionados à cadeia crescente de RNA

Em procariotos, a elongação é um processo relativamente simples. Os ribonucleotídios se ligam a um sítio de entrada na RNA polimerase. Se o ribonucleotídio que entra pareia com a base seguinte no molde de DNA, esse ribonucleotídio é transferido para o sítio ativo da polimerase, e uma nova ligação fosfodiéster é formada. Caso não pareie, o ribonucleotídio é liberado e o processo é repetido até ser encontrado o ribonucleotídio

correto. Após a formação da ligação fosfodiéster, a RNA polimerase se transloca ao longo da cadeia molde de DNA. Considera-se que a RNA polimerase o consegue oscilando uma pequena região helicoidal de sua molécula entre conformações esticadas e dobradas, permitindo à polimerase a deslocação de cerca de 3 Å (= 1 passo de nucleotídio) ao longo da fita antissenso. Após a translocação, é adicionado um novo nucleotídio.

Em eucariotos, depois da RNA polimerase II iniciar a transcrição, um par de fatores reguladores negativos da elongação (NELF e DSIF) aprisionam a RNA polimerase na posição de iniciação. Um complexo RNA-proteína, denominado P-TEFb, é uma cinase que fosforila essas duas moléculas inibidoras, liberando assim a RNA polimerase para prosseguir a síntese de RNA.

O vírus da estomatite vesicular (VSV) e o HIV produzem proteínas virais que estabilizam o complexo da RNA polimerase, quer diretamente quer por recrutamento de fatores do hospedeiro. A proteína TAT do HIV (uma proteína reguladora trans-ativadora) é uma das mais bem conhecidas destas proteínas de estabilização. Mediante interação com a RNA polimerase, a proteína TAT recruta rapidamente o complexo P-TEFb, resultando em uma transcrição aumentada de todo o RNA viral, à custa de RNAs celulares.

O alongamento pode ser um processo rápido, ocorrendo a uma taxa de aproximadamente 40 nt por segundo. Para que o alongamento ocorra, o DNA de fita dupla deve ser continuamente desenovelado, de forma que a fita molde esteja acessível à RNA polimerase. As DNAs **topoisomerases** I e II, enzimas associadas ao complexo de transcrição, movem-se ao longo do molde com a RNA polimerase, separando as fitas de DNA para que elas estejam livres para a síntese de RNA.

Terminação

A terminação da transcrição é catalisada por múltiplos mecanismos, tanto nos procariotos quanto nos eucariotos

Ao final da unidade transcricional, as RNA polimerases terminam a síntese de RNA em sítios definidos. Os mecanismos de terminação transcricional são mais bem entendidos em procariotos do que em eucariotos. Em procariotos, a terminação ocorre por meio de dois mecanismos bem caracterizados, que requerem a formação de alças em grampo na estrutura secundária do RNA (Fig. 33.6). Na terminação intrínseca "*rho*-**in**dependente", uma alça em grampo é formada logo acima da sequência de 6-8 resíduos de uridina (U) localizada próximo à extremidade 3′ do transcrito. A formação dessa estrutura secundária desloca a RNA polimerase do DNA molde, resultando no término da síntese de RNA. Na terminação dependente de *rho*, o transcrito de RNA codifica um sítio de ligação para a proteína *rho*, uma helicase dependente de ATP; a *rho* se liga e viaja ao longo do transcrito de RNA, desenovelando-o do DNA. Ela "segue" a RNA polimerase, mas é mais lenta do que a RNAPol II. Um sítio de terminação *rho* próximo da extremidade da unidade transcricional causa uma pausa da RNAPol II, permitindo à proteína *rho* alcançar e desenovelar o duplex RNA:DNA, deslocando a RNAPol II do molde e parando, dessa

forma, a transcrição.

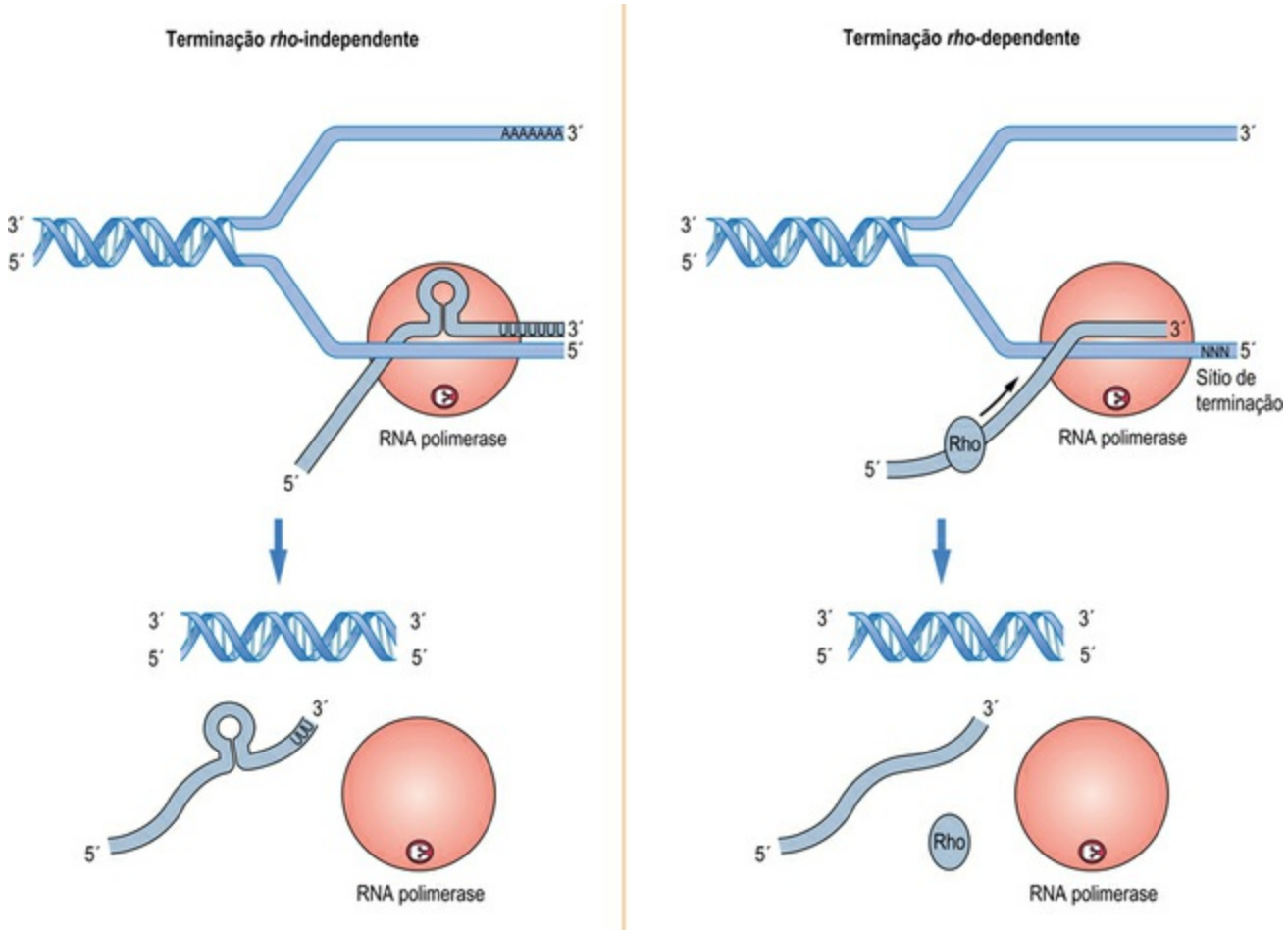


FIG. 33.6 Terminação da transcrição em procariotos.
Dois mecanismos de terminação da transcrição em células bacterianas são conhecidos. A terminação *rho*-independente conta com a formação de uma estrutura secundária no RNA recém-transcrito para expulsar a RNA polimerase do DNA molde e interromper a transcrição. A terminação dependente da *rho* requer a ação da proteína *rho*, uma helicase dependente de ATP. Esta proteína se move ao longo do RNA recém-transcrito, desenovelando o duplex RNA:DNA, alcançando a RNA polimerase quando ela se imobiliza no sítio de terminação e causando a dissociação da polimerase do molde de DNA.

Em eucariotos, as três RNA polimerases utilizam diferentes mecanismos para terminar a transcrição. A RNApol I utiliza uma proteína específica, o fator de terminação de transcrito 1 (TTF1), que se liga a um sítio terminador de 18 nt localizado cerca de 1.000 nt abaixo da sequência codificadora do rRNA. Quando a RNAPol I encontra o TTF1 ligado ao DNA, um fator de liberação catalisa a liberação da polimerase do gene do rRNA. A RNAPol III utiliza um mecanismo que é similar à terminação "*rho*-independente" de bactérias; entretanto, o tamanho do trecho de uridina (U) é menor e não há a necessidade de uma estrutura secundária de RNA para deslocar a RNA polimerase. O mecanismo de terminação pela RNAPol II, que transcreve a maioria dos genes eucarióticos, não é bem compreendido, em parte porque os produtos da RNAPol II são imediatamente processados pela retirada da extremidade 3′ nascente e adição de uma cauda de poliadenosina (poli A).

Quadro clínico

Um micróbio teimoso

Um jovem missionário se apresenta na sua clínica. Ele retornou recentemente de um período prolongado de trabalho no exterior. Ele se queixa de febre, perda de peso, fadiga e sudorese noturna. Ele apresenta tosse produtiva. Ao relatar seu histórico médico, ele conta que um médico local o tratou com rifampicina, um poderoso inibidor da RNA polimerase bacteriana, mas sua condição não melhorou. Na verdade, ele reclama que sua condição piorou. No exame físico, você nota que ele apresenta sons de respiração anormais nos lobos superiores dos pulmões. Uma radiografia do peitoral mostra um infiltrado nodular e desigual nos lobos pulmonares superiores. Você suspeita de tuberculose, de forma que solicita um teste de tuberculina e, já que a cultura de micobactérias pode levar semanas, também solicita um teste baseado em PCR (Cap. 36) específico para a anállise do DNA de *M. tuberculosis*. Você leva o rapaz a uma sala de isolamento. No dia seguinte, o teste baseado em PCR dá positivo para *M. tuberculosis* e, após 72 horas, o teste de tuberculina tem como resultado um endurecimento maior do que 10 mm de diâmetro, indicando uma resposta bastante intensa. O paciente lhe pergunta por que os antibióticos não surtiram efeito.

Comentário

Os antibióticos atuam de forma direcionada a funções específicas da célula. A rifampicina é um inibidor potente de RNA polimerases procarióticas, mas não para as eucarióticas. Como a rifampicina é um dos antibióticos recomendados para tuberculose, mas a condição do paciente piorou, você suspeita que este rapaz possa apresentar uma forma de tuberculose resistente a antibiótico ou resistente a multifármacos (MDR). As formas resistentes a antibióticos são cada vez mais comuns na tuberculose, assim como em muitas outras doenças bacterianas. Você solicita testes de crescimento dos isolados de micobactérias para determinar se a linhagem é de fato resistente a multifármacos (MDR-TB), e imediatamente inicia com o paciente um protocolo com diversos fármacos destinado a combater a MDR-TB. Após duas semanas de doses diárias, o paciente pode receber doses duas a três vezes por semana. A coloração vital da expectoração com diacetato de fluoresceína (FDA), indicativa de bacilos vivos após tratamento inicial com antibiótico, é recomendada para confirmar a MDR-TB. O tratamento continuado da MDR-TB pode se prolongar por 18-24 meses, e devem ser feitas consultas com um especialista em MDR-TB. A recidiva é elevada para a TB resistente a multifármacos, entre 20 e 65%.

Processamento pós-transcricional de ácidos ribonucleicos

A estratégia de vida de procariotos é se replicar o mais rápido possível quando as condições são favoráveis ao crescimento. Os eucariotos possuem uma estratégia de vida mais controlada que investe mais em uma maior regulação para alcançar um crescimento

estável, mas limita a reprodução rápida. Ambas as estratégias são adequadas a cada tipo de organismo, tal como evidenciado pela rica diversidade de vida na Terra; mecanismos de síntese de RNA e processamento se desenvolveram para otimizar cada estratégia de vida. Isso é especificamente verdadeiro para os mRNAs.

Pré-rRNA e pré-tRNA

Os tRNAs e rRNAs são sintetizados como precursores maiores (pré-RNAs) que devem ser processados para gerar transcritos maduros (Fig. 33.7)

Em procariotos, um único transcrito de rRNA 30S (quase 6,5 kb) contém regiões específicas líder e *trailer* (reboque) localizadas nas extremidades 5′ e 3′ dos transcritos, bem como uma cópia de cada um dos rRNAs 23S, 16S e 5S. Os genes de rRNA também contêm vários tRNAs que estão inseridos no transcrito do pré rRNA. O transcrito de rRNA deve ser processado para liberar os RNAs funcionais. A inclusão de cada um dos RNAs ribossomais em um único transcrito é claramente vantajosa para manter a razão das subunidades maior e menor dos ribossomos.

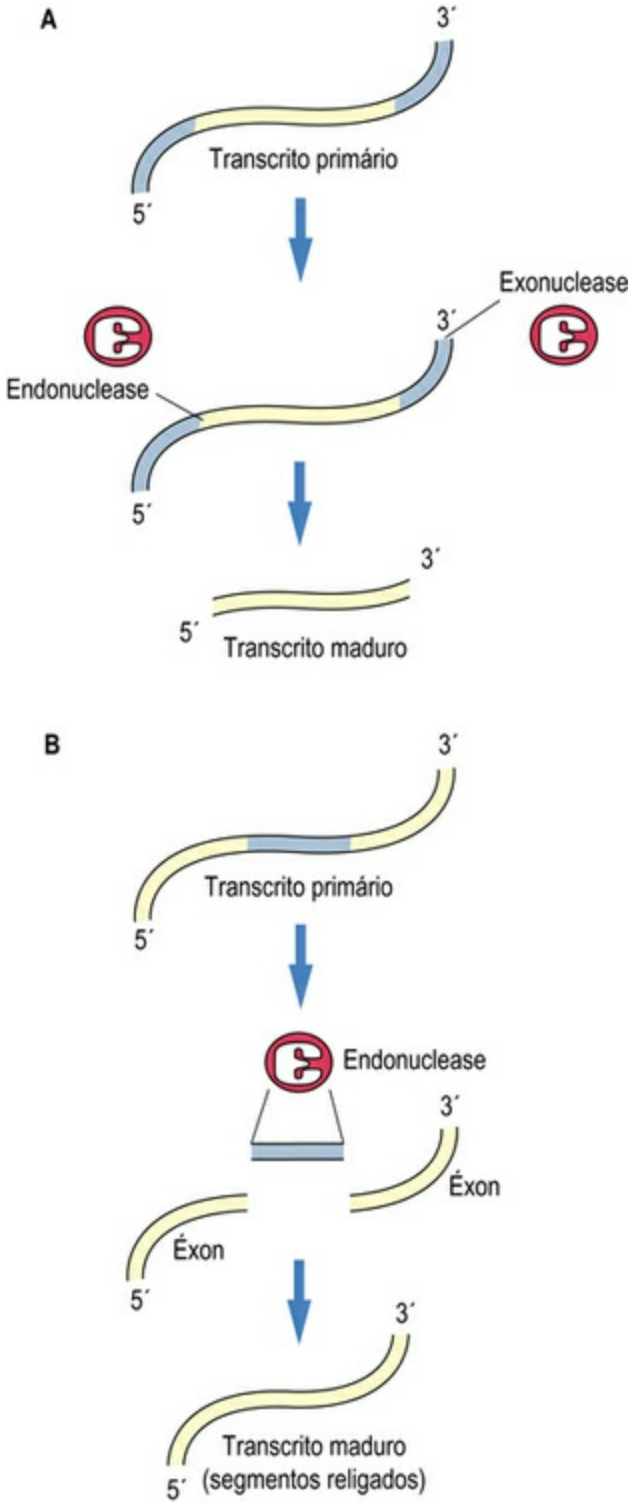


FIG. 33.7 Processamento do RNA.
Existem dois tipos gerais de eventos de processamento do RNA. O processamento de um transcrito de RNA pode envolver (A) a remoção do excesso de sequências pela ação de endonucleases e exonucleases, como ocorre no processamento dos genes de rRNA e tRNA, ou (B) a remoção do excesso de sequências e a religação dos segmentos do RNA recém-sintetizados, como ocorre no *splicing* de mRNAs (ver também Fig. 33.8).

Em procariotos, o processamento de pré-rRNA requer várias RNases. A ribonuclease III (RNase III) cliva o pré-rRNA em regiões de dupla fita. Tais regiões ocorrem em cada extremidade dos rRNAs 16S e 23S, e esta quebra libera estes rRNAs do transcrito de pré-rRNA. Os rRNAs 16S e 23S são posteriormente processados nas extremidades 5′ e 3′; entretanto, esse processamento requer a presença de proteínas ribossomais específicas e ocorre durante a montagem do ribossomo.

Em todos os eucariotos, de leveduras a mamíferos, os transcritos de pré-rRNA são processados de maneira similar ao processamento do pré-rRNA procariótico. Cada transcrito de rRNA 45 (aproximadamente 13,7 kb) inclui uma única cópia dos rRNAs 18S, 5,8S e 28S (em eucariotos, o rRNA 5S é codificado separadamente). Entretanto, o processamento do rRNA humano é mais complexo. O transcrito de pré-rRNA deve ser clivado em 11 sítios diferentes para gerar os rRNAs 18S, 28S e 5,8S maduros. O processamento ocorre em um grande complexo de ribonucleoproteínas denominado **processomo.** Além de modificações por clivagem, o rRNA humano maduro contém 115 modificações de grupamentos metil específicos (na maioria das quais o grupo metila é adicionado ao grupo 2′-hidroxila, 2′-*O*-metila do esqueleto ribosil) e 95 conversões específicas de uridina em pseudouridina (ψ). Essas modificações são introduzidas no pré-rRNA pela interação com complexos de proteínas de RNA nucleolares pequenas (**snoRNPs,** pronuncia-se *snorps*). Cada uma dessas snoRNPs contém um único RNA-guia (aproximadamente 60-300 nt de comprimento) e entre uma a quatro moléculas de proteínas. Cada snoRNP é específica para um único ou no máximo alguns sítios de modificação individuais. O componente **snoRNA** (RNA pequeno ribonucleolar) das snRNPs contém motivos estruturais que pertencem a dois grupos, a C/D box ou a H/ACA box. Essas sequências dirigem a ligação de snoRNPs a sítios nas moléculas de pré-rRNA à custa de uma sequência complementar de nucleotídios (~10-20 nucleotídios). Isso posiciona corretamente uma metiltransferase (box C/D) ou uma pseudouridina sintase (box H/ACA) ao longo do pré-rRNA para modificação. O processomo contém ≥100 snoRNAs, assim como mais de 100 proteínas individuais.



Quadro de conceitos avançados

Ribozimas: RNAs que atuam como enzimas

Em alguns casos, os RNAs possuem atividade catalítica similar a alguns tipos de atividades previamente atribuídas somente a proteínas (isto é, atividade de ribonuclease). Essas moléculas catalíticas incomuns são conhecidas como ribozimas. A especificidade de substrato de uma ribozima é determinada pelo pareamento de bases nucleotídicas entre sequências complementares contidas dentro da enzima e do substrato de RNA que ela cliva. Da mesma maneira que as enzimas proteicas, a ribozima clivará seu substrato de RNA em um sítio específico e, então, o liberará, sem ser consumida pela reação. Alguns vírus de RNA, especialmente vírus de plantas e partículas do tipo vírus, tais como o agente delta ou o vírus da hepatite D (HVD), que utiliza o ciclo de replicação por círculo rolante, conta com a ação de ribozimas para clivar os RNAs virais do produto de pré-RNA.

Uma vez que as sequências necessárias à atividade da ribozima foram identificadas, as ribozimas podem ser desenhadas de forma a clivarem RNAs específicos de alelos. As ribozimas recombinantes estão sendo consideradas como possíveis agentes terapêuticos para doenças como a distrofia muscular (DM1), doenças de Alzheimer, Huntington e Parkinson, que são causadas pela expressão inapropriada de um RNA ou

pela expressão de um RNA mutado, que participa nos patomecanismos da doença. Resultados experimentais recentes em cultura celular sugerem que as estratégias baseadas em ribozimas podem ser altamente bem-sucedidas nas abordagens terapêuticas para tais doenças.

Além dos genes de rRNA, os tRNAs também são sintetizados sob uma forma precursora. Até sete tRNAs individuais podem ser sintetizados de um único gene de pré-tRNA. O processamento dos tRNAs de um pré-tRNA requer uma RNase P, que cliva cada tRNA do pré-tRNA por uma única quebra na extremidade 5′. A RNAse P é um complexo RNA–proteína contendo um RNA de 377 nucleotídios e uma proteína de 20 kDa, embora a porção proteica não seja necessária à atividade enzimática, isto é, o RNA é catalítico *per se*. A descoberta do auto-*splicing* do RNA — quer dizer, RNA com uma atividade enzimática, uma **ribozima** — levou a novas ideias sobre a evolução celular inicial, a qual originalmente se acreditou ter começado com aminoácidos e proteínas. Acredita-se agora que ribonucleotídios e RNA devam ter sido os biopolímeros catalíticos mais primitivos a terem se formado na Terra, fornecendo diversidade genética, e que DNA e proteínas devam ter surgido posteriormente. Uma terceira enzima, a RNase D, apara os nucleotídios extras da extremidade 3′ dos pré-tRNAs, deixando o CCA invariável encontrado na extremidade 3′ de cada tRNA. Alguns tRNAs também contêm íntrons na alça do anticódon, que devem ser removidos durante o processamento.

Processamento do pré-mRNA

Os procariotos sintetizam rapidamente seus mRNAs e, tipicamente, não os processam ou modificam; tanto a extremidade 5′ quanto a 3′ dos mRNAs procarióticos é nua e desprotegida. Como consequência, mesmo os mRNAs recém-sintetizados são rapidamente degradados por RNases celulares normais. Isso não é um problema para estes organismos de crescimento rápido; eles são capazes de alterar rapidamente a síntese de mRNA para a produção imediata de proteínas. Depois de terem sido supridas todas as suas necessidades imediatas, eles degradam subsequentemente seus mRNAs e reutilizam os ribonucleotídios para a síntese de outros mRNAs. A meia-vida típica do mRNA procariótico é de cerca de três minutos. Pelo contrário, os eucariotos tomam medidas de precaução especiais para manter seus mRNAs em forma estável para uso continuado. Os tempos de meia-vida dos mRNAs em eucariotos variam desde alguns minutos, para alguns fatores de transcrição altamente regulados, até 30 horas, para alguns transcritos mais longevos.

Os mRNAs eucarióticos possuem tempos de meia-vida mais longos do que os mRNAs procarióticos graças a modificações protetoras em suas extremidades 3′ e 5′

Os eucariotos desenvolveram métodos para proteger cada extremidade do mRNA. Na extremidade 5′, uma única estrutura denominada “cap 5” é adicionada. Esse cap consiste em um resíduo de **7-metilguanidina** ligado em orientação inversa ao primeiro nucleotídio do mRNA, isto é, por uma ligação 5′ ao 5′ trifosfato (m^7Gppp). A maioria das exo-RNases

celulares não é capaz de hidrolisar este cap do mRNA, de forma que a extremidade 5′ está imune à sua presença. Na extremidade 3′ de quase todos os mRNAs eucarióticos (com exceção dos mRNAs de histonas), uma marca de poliadenosina é adicionada, denominada **cauda poli A.** Os resíduos de adenosina não são codificados pelo DNA, mas em vez disso são adicionados pela ação da poli(A) polimerase utilizando ATP como substrato. Essa cauda poli A frequentemente tem um comprimento >250 nucleotídios. Embora ele seja ainda suscetível à ação de exo-RNases, a presença da cauda poli A reduz significativamente o *turnover* do mRNA, aumentando, desse modo, seu tempo de vida. A presença da cauda poli A tem sido historicamente usada para isolar o mRNA de células eucarióticas.

O spliceossomo une éxons do pré-mRNA para formar um mRNA maduro

Nos processamentos pós-transcricionais mais complicados de mRNAs eucarióticos, sequências denominadas **íntrons** (sequências intervenientes) são removidas do transcrito primário (pré- RNA, uma forma de hnRNA) e os segmentos remanescentes, denominados *éxons* (sequências expressas), são ligados para formar um RNA funcional. Este processo envolve um complexo grande de proteínas e RNAs auxiliares chamados pequenos RNAs nucleares (snRNAs), os quais interagem para formar um *spliceossomo*. A função dos cinco snRNAs (U1, U2, U4, U5 e U6) no *spliceossomo* é ajudar a posicionar os grupamentos reativos dentro do substrato, a molécula de RNA, de modo que os íntrons possam ser removidos e os éxons apropriados possam ser rearranjados corretamente (Tabela 33.3). Os snRNAs realizam esta tarefa se ligando, por meio de interações de pareamento de bases, com os sítios no mRNA que representam os limites íntron/éxon.

Tabela 33.3

A função de pequenos RNAs nucleares (snRNAs) no *splicing* de mRNAs

snRNA	Tamanho	Função
U1	165 nt	Liga-se ao limite 5′ éxon/íntron
U2	185 nt	Liga-se ao sítio de ramificação no íntron
U4	145 nt	Ajuda a montar o *spliceossomo*
U5	116 nt	Liga-se ao limite 3′ íntron/éxon
U6	106 nt	Desloca U1 após o primeiro rearranjo

Pode-se considerar que a remoção de um íntron e a reunião de dois éxons ocorre em três passos (Fig. 33.8). O primeiro passo envolve a ligação da snRNP U1 à fronteira éxon/íntron na extremidade 5′ do íntron, juntamente com a ligação da snRNP U2 a um nucleotídio de adenina-alvo, geralmente encontrado a cerca de 30 nt da extremidade 3′ do íntron. Após a ligação do complexo snRNP U4/U5/U6 imediatamente a montante do sítio de *splice* 5′, o íntron forma uma estrutura em laço consigo mesmo, posicionando as extremidades dos íntrons na orientação correta. Neste processo, a snRNP U6 desloca a snRNP U1 do mRNA. Subsequentemente, uma reação de transesterificação entre o 2′-

hidroxila da adenosina-alvo com a ligação fosfodiéster do resíduo 5′-guanosina do íntron quebra o local de *splice* a montante e forma uma estrutura em cadeia ramificada, na qual a adenina-alvo possui grupos 2′-, 3′- e 5′-fosfato. A estrutura em laço do íntron é similar, em aparência, ao laço de um cauboi. Após um rearranjo físico subsequente, que libera a snRNP U4, uma segunda transesterificação liga a extremidade 3′ do éxon 1 à extremidade 5′ do éxon 2. Então, o *spliceossomo* se desmonta, liberando a **estrutura em laço,** que é degradada, e o mRNA maduro fica pronto para processamento adicional, incluindo a adição do cap M7G e da cauda poli A e a exportação nuclear.

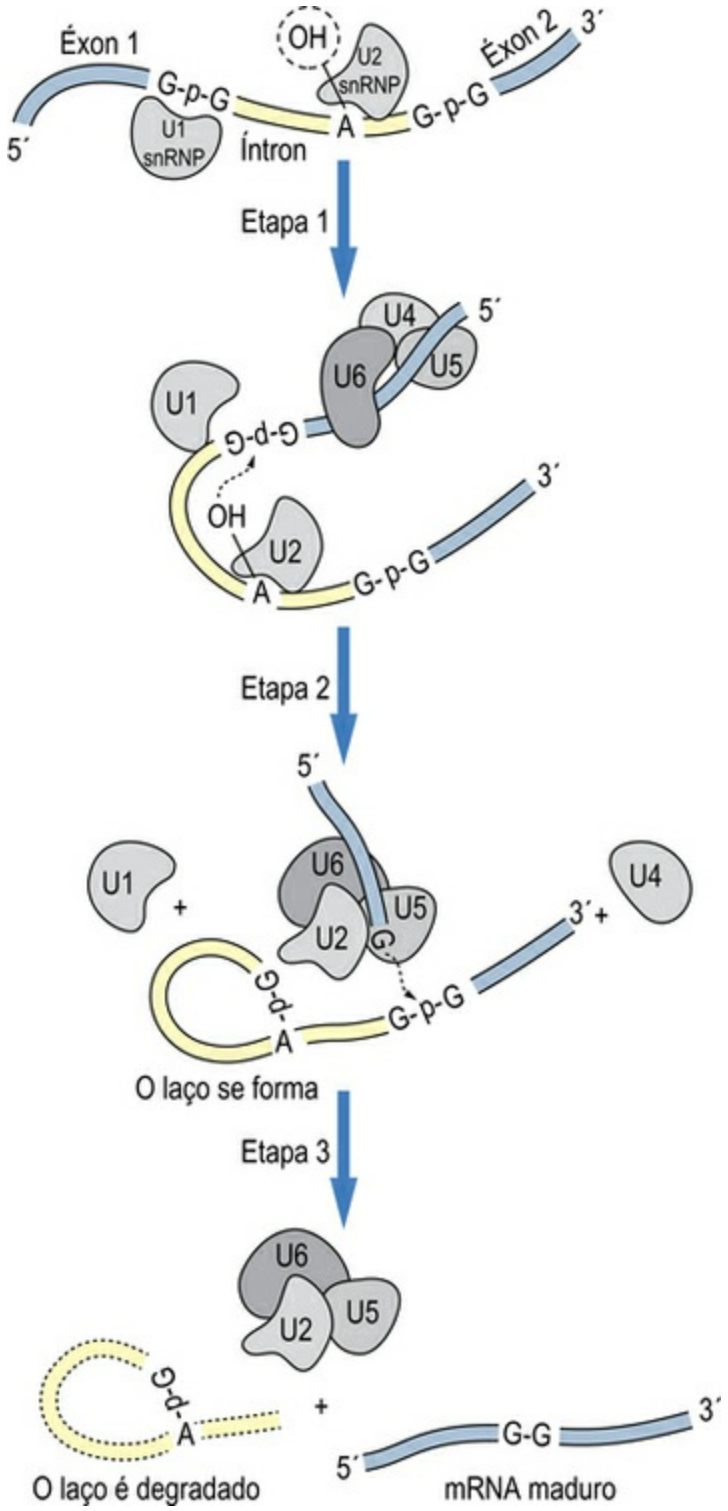


FIG. 33.8 *Splicing* do RNA.
O *splicing* do RNA é um processo com várias etapas catalisado por complexos de ribonucleoproteínas, e se encontra simplificado no diagrama acima. Em uma reação de transesterificação, a ligação fosfato de um resíduo de guanosina no limite 5' do éxon/íntron é quebrada e ligada ao 2'-OH de um resíduo de adenina localizado no meio do íntron. Em uma etapa posterior, a ligação fosfato no limite 3' do íntron/éxon é primeiro clivada e, então, os dois éxons são unidos pela formação de uma nova ligação fosfodiéster entre os nucleotídios em ambas as extremidades dos éxons. O íntron é eliminado sob a forma de uma estrutura de laço, tornada cíclica por um resíduo de adenosina fosforilado nos carbonos 2', 3' e 5'. N = qualquer nucleótido.

O *splicing* alternativo produz múltiplos mRNAs maduros a partir de um único transcrito de pré-mRNA

A maioria dos mRNAs eucarióticos consiste em múltiplos íntrons e múltiplos éxons. Se o

splicing fosse realizado corretamente, somente um único mRNA maduro resultaria dos pré-mRNAs. Contudo, muitos genes eucarióticos sofrem um processo chamado *splicing* alternativo, no qual diferentes regiões do mRNA são removidas do pré-mRNA, resultando em múltiplos mRNAs maduros, com diferentes sequências (Fig. 33.3). Quando esses mRNAs diferentes são traduzidos, múltiplas isoformas de proteínas são formadas. Em seres humanos, quase 60% dos pré-mRNAs originam múltiplos mRNAs maduros seguindo o *splicing* alternativo. Cerca de 80% desses mRNAs que sofrem o *splicing* alternativo resultam em variações das proteínas codificadas (eventos de *splicing* também podem ocorrer nas regiões 5′ e 3′ não traduzidas). O *splicing* alternativo pode resultar em inserção ou deleção de aminoácidos na sequência da proteína, mudanças de fases de leitura ou mesmo a introdução de novos códons de parada. Ele também pode adicionar ou remover sequências de mRNA capazes de alterar elementos regulatórios, afetando tradução, estabilidade do mRNA ou localização subcelular. Em vertebrados, os íntrons de muitos genes de proteínas ribossomais contêm as sequências dos pequenos RNAs nucleolares (snoRNAs) que atuam na modificação de resíduos específicos nos rRNAs e tRNAs; entretanto, muitos íntrons não contêm essas sequências, e sua função permanece obscura.

Quadro de conceitos avançados

Imprinting genômico

Os snoRNAs também atuam no *imprinting* genômico. O *imprinting* genômico é um processo epigenético que resulta em expressão diferencial dos genes de origem materna e paterna no desenvolvimento do embrião. Esse processo ocorre tanto em mamíferos quanto em plantas. Genes específicos são metilados durante a meiose e, portanto, inativados. Essa metilação ocorre diferencialmente no desenvolvimento do ovócito e do espermatócito, inativando, assim, unicamente tanto os alelos maternos quanto os paternos durante o desenvolvimento embrionário. O *imprinting* genômico pode afetar um grande número de condições em humanos, incluindo a suscetibilidade à asma, ao câncer, ao diabetes, à obesidade e a inúmeras desordens do desenvolvimento, incluindo as síndromes de Angelman e de Prader-Willi. Esses distúrbios são causados pela deleção da mesma região (banda 11) do cromossomo 15. No entanto, a herança paterna desta deleção resulta na síndrome de Prader-Willi, ao passo que a herança materna origina a síndrome de Angelman. Estes são distúrbios distintos, já que a região deletada contém dois genes expressos no pai (a proteína N associada a pequena ribonucleoproteína nuclear e a necdina) e um gene expresso na mãe (ubiquitina-proteína ligase E3A). Sabe-se que pelo menos 83 genes humanos, e mais de 1.300 em ratos, sofrem *imprinting*.

Os editossomos modificam a sequência nucleotídica dos mRNAs maduros

Finalmente, em certos casos, os mRNAs são editados após a transcrição por meio de um dentre vários mecanismos diferentes. Estes incluem modificações específicas de C para

U, catalisadas por citosinas desaminases, ou modificações de A para I, catalisadas por adenosinas desaminases, ou deleções simples ou múltiplas de resíduos U para alterar a sequência de nucleotídios do mRNA. Essas alterações levam a diferenças nos códons, resultando em sequências alteradas das proteínas que diferem da sequência codificada no nível de gene (Cap. 35). Um complexo multiproteico grande denominado editossomo está envolvido nesse processo. Os snoRNAs que atuam na modificação de rRNA e de tRNA também atuam nesses processos de edição de RNA. Esses snoRNAs se ligam aos sítios de edição dentro dos mRNAs e posicionam o editossomo com a atividade de citosina desaminase ou adenosina desaminase na posição correta para completar a modificação.

Degradação ou inativação seletiva do ácido ribonucleico

O interferon ativa vias que inibem a proliferação de vírus de RNA

Os vírus de RNA representam um importante desafio para as células eucarióticas; entretanto, os mecanismos naturais de defesa evoluíram para limitar a infecção viral. Os vírus de RNA geralmente formam uma dupla fita (ds) replicativa intermediária durante o seu ciclo de vida, e esse dsRNA é uma estrutura única não comumente encontrada em células eucarióticas. Ele pode ser reconhecido por proteínas que se ligam a dsRNA, desencadeando, em seguida, respostas para limitar a infecção viral. Um desses mecanismos envolve a **proteína cinase R ativada por dsRNA (PKR).** Quando ativada pela ligação do dsRNA, essa enzima pode fosforilar e inativar o fator de tradução de proteína, eIF2α, diminuindo, assim, a tradução de RNA viral. Do mesmo modo, quando ativada pelo dsRNA, a enzima 2′-5′ oligoadenilato sintase polimeriza ATP em uma série de pequenos nucleotídios (2′-5′oligoadenilato, 2-5A), que difere da estrutura 5′-3′ encontrada no RNA normal. A forma mais ativa é o trímero pppA-2′-p-5′-A-2′-p-5′-A. O acúmulo de 2-5A inibe a tradução de proteínas virais (e do hospedeiro) pela ativação de uma endorribonuclease (RNase L) que degrada indiscriminadamente tanto os mRNAs quanto os rRNAs dentro da célula. Ambos os genes, PKR e 2-5A sintase, são induzidos por interferon, que é regulado positivamente pela infecção **viral.** Isto resulta em um mecanismo de amplificação eficiente, levando à morte celular programada **(apoptose)** para limitar o crescimento e disseminação do vírus.



Quadro de conceitos avançados

O RNAi como uma opção terapêutica

A degeneração macular relacionada à idade (AMD) é a principal causa de cegueira entre os idosos nos países desenvolvidos. A AMD resulta de uma atrofia da mácula, na retina. O resultado da atrofia é a perda da visão central, que pode levar à incapacidade de ler ou mesmo reconhecer rostos. O tipo mais grave de AMD (a forma úmida) causa perda de visão devido ao crescimento de vasos sanguíneos (neovascularização) nos

capilares da retina que, se não for tratado, leva a um extravasamento de sangue e proteína sob a mácula. Isto, por fim, causa uma cicatriz e dano irreversível aos fotorreceptores.

Um mecanismo que causa neovascularização é a expressão anormal na retina do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que é pró-angiogênico, o qual resulta em desenvolvimento dos vasos sanguíneos. Um dos tratamentos propostos é o uso de anticorpos anti-VEGF (ranibizumabe [Lucentis] ou bevacizumabe [Avastin]) injetados uma vez ao mês diretamente no humor vítreo do olho. Esses anticorpos se ligam ao VEGF, inativando-o, o que reduz o nível de angiogênese e prolonga a visão.

A capacidade de uma célula de regular negativamente os níveis de mRNA específico acoplada à área de tratamento localizado oferecida pelo humor vítreo torna o gene do VEGF um candidato ideal para a regulação negativa mediada por RNAi. Pequenas moléculas de RNA complementares ao mRNA do VEGF são injetadas no humor vítreo. Quando essas moléculas são internalizadas pelas células, funcionam como siRNAs, causando degradação do mRNA do VEGF e diminuindo a biossíntese de VEGF. Ensaios clínicos de fase I demonstraram que >75% dos pacientes apresentaram visão melhorada ou estável duas semanas após uma injeção única do siRNA PF-655, e que a injeção intravítrea dos siRNAs nus era segura em doses até 3 mg. Uma abordagem similar deve também funcionar para o tratamento da retinopatia diabética. Outros ensaios com RNAi estão atualmente em andamento para o vírus respiratório sincicial (RSV), hepatite C, doença de Huntington, HIV e câncer.

Os RNAis exercem efeitos de amplo alcance na expressão gênica

Outro processo importante da imunidade celular inata envolve marcar de forma específica sequências de RNA para rápida degradação. Esse processo é chamado **RNA de interferência** (RNAi) (Cap. 35) ou silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS). Enquanto se acredita que este processo tenha evoluído como uma defesa contra os vírus de RNA de fita dupla, ele também atua como um mecanismo endógeno de regulação gênica durante o desenvolvimento de muitos eucariotos. O PTGS começa quando um RNA duplex é reconhecido dentro das células pela enzima Dicer. A **Dicer** é uma endonuclease ativa contra dsRNAs. Ela produz pequenos fragmentos de RNA duplex com comprimentos de 21 a 25 nucleotídios, designados RNAs interferentes pequenos (siRNAs) ou microRNAs (miRNAs). Enquanto os siRNAs derivam geralmente de dsRNAs produzidos por vírus, os miRNAs são transcritos a partir de íntrons de genes normais ou de outros genes não codificantes de proteínas, revelando todos eles regulação e expressão precisas. Essas sequências de miRNA formam estruturas em grampo de cabelo que são reconhecidas pela Dicer para liberar os múltiplos pequenos miRNAs.

Os miRNAs interagem com um complexo multiproteico, denominado complexo silenciador induzido por RNA, o **RISC.** O RISC é constituído por vários componentes, incluindo a enzima **Argonauta.** A Argonauta se liga aos pequenos fragmentos de dsRNA, os desenovela e incorpora uma das cadeias (a cadeia guia) para atuar como um fator direcionado para o RNA; a outra cadeia é degradada. Usando o si/miRNA incorporado, o

complexo RISC pode identificar sequências complementares a seu RNA, após o que ele irá parear, por complementaridade de bases, e clivar os RNAs complementares, despoletando a rápida degradação dos RNAs complementares (siRNAs), ou irá recrutar proteínas adicionais que reprimem a tradução dos RNAs complementares através de múltiplos mecanismos (miRNAs).

Em humanos, poderão funcionar até 1.000 miRNAs. Alguns miRNAs têm como alvo múltiplos genes, alguns genes são alvo de múltiplos miRNAs, e os miRNAs estão provavelmente envolvidos, de alguma forma, na regulação da maioria das vias metabólicas. Os miRNAs regulam processos metabólicos centrais, como a diferenciação de adipócitos e a secreção de insulina, os quais estão envolvidos no desenvolvimento da obesidade e do diabetes. Recentemente, o miRNA miR-21 foi identificado como um sinal antiapoptótico. Este miRNA mantém respostas apoptóticas normais nas células. Quando o miR-21 se encontra aberrantemente expresso, como acontece em muitas formas de câncer, ele inibe a apoptose e promove a proliferação celular.

Resumo

- Os principais produtos da transcrição são os rRNAs, tRNAs e mRNAs. Estes RNAs desempenham funções específicas no interior da célula. Os mRNAs carregam a informação genética do DNA nuclear para os ribossomos para a síntese de proteínas. Os rRNAs interagem com proteínas para formar os ribossomos, a maquinaria celular básica na qual ocorre a síntese de proteínas. Os tRNAs atuam como carreadores de aminoácidos que traduzem a informação armazenada na sequência de nucleotídios do mRNA para a sequência de aminoácidos das proteínas.
- Nas células eucarióticas, cada uma dessas classes de RNA é produzida por uma RNA polimerase diferente e específica (RNA pol I, II e III, respectivamente), enquanto nas células bacterianas uma única RNA polimerase sintetiza as três classes de RNA.
- As estruturas básicas dos rRNAs e tRNAs de células eucarióticas e bacterianas são semelhantes. Entretanto, os mRNAs de células eucarióticas possuem um cap (m^7Gppp) 5′ e uma cauda ($[A]_n$) 3′. Os transcritos de mRNAs procarióticos não têm estas modificações em suas extremidades 5′ e 3′ e podem ser policistrônicos.
- A maioria, mas não todos, dos mRNAs eucarióticos sofrem um processo chamado *splicing* para se tornar funcional, enquanto mRNAs procarióticos são funcionais assim que são sintetizados. O *splicing* envolve a remoção de sequências denominadas íntrons e a religação das sequências de éxons umas com as outras para formar um mRNA maduro e funcional.
- O processo de transcrição consiste em três etapas: iniciação, alongamento e terminação. A iniciação envolve o reconhecimento e a ligação de sequências promotoras pela RNA polimerase e cofatores transcricionais associados. O alongamento envolve a seleção do nucleotídio apropriado e a formação das pontes fosfodiéster entre cada nucleotídio de uma molécula de RNA. Finalmente, a terminação envolve a dissociação da RNA polimerase do DNA molde. Isto é mediado pela estrutura secundária do RNA ou por fatores proteicos específicos.

- Mecanismos celulares singulares reconhecem o RNA de fita dupla e limitam a infecção viral por vários mecanismos, alguns induzem a degradação do mRNA total e outros marcam mRNAs específicos para degradação.

Questões para aprendizagem

1. Que antibióticos comumente usados são direcionados para a inibição de RNA polimerase bacteriana, mas não afetam o complexo de mamíferos? Por que esses fármacossão menos eficazes contra infecções de fungos?
2. Reveja a patogênese do lúpus eritematoso sistêmico, uma doença autoimune na qual anticorpos contra partículas ribonucleoproteicas estão associados ao desenvolvimento de inflamação crônica.
3. Reveja a patogênese das talassemias, com ênfase nas variantes cujas mutações gênicas afetam a síntese, o processamento e o *splicing* do RNA da hemoglobina levando à anemia.

Leituras sugeridas

Atasoy, D., Betley, J. N., Su, H. H., et al. Deconstruction of a neural circuit for hunger. *Nature*. 2012; 488:172–177.

Bora, R. S., Gupta, D., Mukkur, T. K., et al. RNA interference therapeutics for cancer: challenges and opportunities (review). *Mol Med Report*. 2012; 6:9–15.

Bumcrot, D., Manoharan, M., Koteliansky, V., et al. RNAi-therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs. *Nat Chem Biol*. 2006; 2:711–719.

Butler, M. G. Prader–Willi syndrome: obesity due to genomic imprinting. *Curr Genomics*. 2011; 12:204–215.

David, C. J., Chen, M., Assanah, M., et al. HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer. *Nature*. 2010; 463:364–368.

Davis, M. E., Zuckerman, J. E., Choi, C. H., et al. Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *Nature*. 2010; 464:1067–1070.

Ishida, M., Moore, G. E. The role of imprinted genes in humans. *Mol Aspects Med*. 2013; 34:826–840.

Kaiser, P. K., Symons, R. C., Shah, S. M., et al. RNAi-based treatment for neovascular age-related macular degeneration by Sirna-027. *Am J Ophthalmol*. 2010; 150:33–39.

Keaney, J., Campbell, M., Humphries, P. From RNA interference technology to effective therapy: how far have we come and how far to go? *Ther Deliv*. 2011; 2:1395–1406.

Liu, H., He, L., Tang, L. Alternative splicing regulation and cell lineage differentiation. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2012; 7:400–406.

Mastroyiannopoulos, N. P., Uney, J. B., Leonidas, A., et al. The application of ribozymes and DNAzymes in muscle and brain. *Molecules*. 2010; 15:5460–5472.

Matlin, A. J., Clark, F., Smith, C. W.J. Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005; 6:386–398.

Zhou, J., Rossi, J. J. Progress in RNAi-based antiviral therapeutics. *Methods Mol Biol*. 2011; 721:67–75.

Sites

RNA polymerase:

www.rcsb.org/pdb/101/motm.do?momID=40

en.wikipedia.org/wiki/RNA_polymeraseα-Amanitin:

toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+3458
emedicine.medscape.com/article/1008902-overview

RNAi:

nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2006/index.html
www.youtube.com/watch?v(cK-OGB1_ELE
www.pbs.org/wgbh/nova/body/rnai-cure.html

Macular degeneration:

www.ahaf.org/macular/
www.lucentis.com/lucentis/
www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00470977?term=NCT00470977&rank=1

Spliceosome:

neuromuscular.wustl.edu/pathol/spliceosome.htm
www.rcsb.org/pdb/101/motm.do?momID=65

Alternative splicing:

en.wikibooks.org/wiki/Proteomics/Alternative_splicing_and_its_impact_on_protein_identification
www.eurasnet.info/alternative-splicing/what-is-alternative-splicing

CAPÍTULO 34

Síntese e Reciclagem de Proteínas

Jeffrey R. Patton and Gary A. Bannon

Objetivos

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever como os vários RNAs envolvidos na síntese proteica interagem para produzir um polipeptídio.
- Identificar a estrutura e redundância do código genético.
- Explicar como as proteínas são direcionadas para organelas subcelulares específicas.
- Descrever as etapas principais na síntese e degradação de uma proteína citosólica.

Introdução

A tradução é o processo pelo qual a informação codificada em um mRNA é traduzida para a estrutura primária de uma proteína

A síntese de proteínas ou tradução representa o ápice da transferência de informação genética, armazenada como bases nucleotídicas no ácido desoxirribonucleico (DNA), para moléculas de proteína que são os principais componentes estruturais e funcionais das células vivas. É durante a tradução que essa informação, expressa como uma sequência específica de nucleotídios em uma molécula de ácido ribonucleico (mRNA) é usada para direcionar a síntese de uma proteína. A proteína então se dobra em uma estrutura tridimensional que é determinada, em grande parte, pela sua sequência e aminoácidos. Para traduzir um mRNA em proteína, três componentes básicos de RNA são necessários:

- ribossomos, contendo RNA ribossomal (rRNA),
- RNA mensageiro (mRNA),
- RNA de transferência (tRNA).

O ribossomo, composto de rRNAs e diversas proteínas, é uma máquina

macromolecular na qual ocorre toda a síntese proteica. A informação necessária para dirigir a síntese da sequência primária da proteína está contida no mRNA. Os aminoácidos que serão incorporados na proteína estão acoplados aos tRNAs. O ribossomo interage com as moléculas de tRNA e mRNA para que o aminoácido certo seja incorporado à proteína. A tradução do mRNA se inicia próximo à extremidade 5′ da fita molde e segue em direção à extremidade 3′, e as proteínas são sintetizadas de sua porção aminoterminal. Portanto a extremidade 5′ do RNA codifica a porção aminoterminal da proteína e a extremidade 3′ do RNA codifica a porção carboxiterminal da proteína.

Este capítulo começa com uma introdução ao código genético e os componentes necessários para a síntese proteica. Em seguida temos a apresentação da estrutura e função do ribossomo, detalhando o processo de tradução descrevendo a iniciação, o alongamento e a terminação da síntese proteica e os mecanismos pelos quais as proteínas são direcionadas para locais específicos na célula. Mais à frente discutem-se as modificações pós-transcricionais das proteínas, e o capítulo termina com a descrição do papel de um segundo complexo macromolecular, o proteassoma, na reciclagem de proteínas.

O código genético

O código genético é degenerado e não é totalmente universal

O mRNA que será utilizado na tradução possui somente quatro nucleotídios – adenosina, A; citosina, C; guanina, G; e uracil, U –, mas codificará uma proteína contendo até 20 aminoácidos diferentes, portanto não há uma correlação de um para um entre as sequências de nucleotídios e aminoácidos; em vez disso, séries de três nucleotídios no mRNA, conhecidas como códons, são necessárias para especificar cada aminoácido. Quando se levam em conta todas as combinações dos quatro nucleotídios, sendo três de cada vez, se obtêm 64 códons possíveis (Tabela 34.1). Três desses códons (UAA, UAG, UGA) são **códons de parada**, usados para sinalizar a terminação da síntese proteica; eles não especificam um aminoácido. Os outros especificam os 20 aminoácidos, o que ilustra uma característica do código genético conhecida como **degeneração**: mais de um códon pode especificar um aminoácido específico. Por exemplo, os códons GUU, GUC, GUA e GUG codificam para o aminoácido valina. De fato, todos os aminoácidos, com exceção da metionina (AUG) e do triptofano (UGG), possuem mais de um códon. O códon AUG, que especifica somente a metionina, codifica a metionina sempre que aparece no RNA e também marca o ponto de partida para a síntese proteica (ver adiante algumas exceções).

Tabela 34.1
O código genético

1.ª posição	2.ª posição				3.ª posição
	G	A	C	U	
G	Gly	Glu	Ala	Val	G
	Gly	Glu	Ala	Val	A
	Gly	Asp	Ala	Val	C
	Gly	Asp	Ala	Val	U
A	Arg	Lys	Thr	Met	G
	Arg	Lys	Thr	Ile	A
	Ser	Asn	Thr	Ile	C
	Ser	Asn	Thr	Ile	U
C	Arg	Gln	Pro	Leu	G
	Arg	Gln	Pro	Leu	A
	Arg	His	Pro	Leu	C
	Arg	His	Pro	Leu	U
U	Trp	Término	Ser	Leu	G
	Término	Término	Ser	Leu	A
	Cys	Tyr	Ser	Phe	C
	Cys	Tyr	Ser	Phe	U

O código genético é degenerado, o que significa que mais de um códon pode codificar um aminoácido, e, em muitos casos, alterar o nucleotídio na terceira posição não altera o aminoácido codificado. Para encontrar a(s) sequência(s) de códons que codifica(m) um aminoácido em particular, é preciso apenas encontrar o aminoácido na tabela e combinar a sequência de nucleotídios para cada posição. Por exemplo, a metionina (Met) é codificada pela sequência AUG. Para encontrar o aminoácido que corresponde à sequência do códon basta inverter o processo.

O código genético especificado pela trinca de nucleotídios é, em grande parte, o mesmo para bactérias e humanos e é classificado como "universal". No entanto existem exceções e alguns exemplos são encontrados em bactérias e mitocôndrias. Em bactérias, se os códons GUG e UUG aparecerem no início da síntese proteica, podem ser lidos como o códon para metionina. Existem também pequenas diferenças no código genético de mitocôndrias; por exemplo, nas mitocôndrias de vertebrados existem códons adicionais que podem codificar a metionina, como a UGA, que normalmente é um códon de término e codifica o triptofano, e há códons de término adicionais.



Quadro clínico

Anemia falciforme: uma mutação do código genético

A anemia falciforme é um exemplo de uma doença na qual a mudança de um único

nucleotídio na região codificante do gene para a cadeia β da hemoglobina A, a forma principal de hemoglobina no adulto, produz uma proteína alterada e com a função comprometida (Cap. 5). A mutação que causa essa doença é uma mudança em um único nucleotídio em um códon que normalmente codifica o glutamato (GAG) e que passa a produzir um códon que especifica a valina (GUG). Em condições de baixa tensão de oxigênio, essa única troca de aminoácidos permite que a proteína se polimerize em estruturas com forma de bastão, resultando na deformação das hemácias e na alteração da fluidez dessas células nos vasos e capilares. Quando o oxigênio não está ligado à hemoglobina, a conformação da proteína, desoxi-hemoglobina, expõe uma porção hidrofóbica, permitindo que as proteínas mutantes com valina interajam mais facilmente e formem bastões. A substituição de um aminoácido com uma cadeia lateral ácida por um aminoácido com uma cadeia lateral apolar e hidrofóbica é denominada mutação não conservadora. Substituições conservadoras de um aminoácido por outro com propriedades físicas e químicas similares podem ter consequências menos graves, como, por exemplo, uma mutação Arg → Lys ou Asp → Glu.

Outro aspecto do código genético é que, uma vez iniciada a síntese em um códon AUG para metionina, cada trinca daquele ponto será lida sem interrupções até que se encontre um códon de término. Assim, o **quadro de leitura** do mRNA será ditado pelo códon de iniciação. Mutações que levem à adição ou à deleção de um único nucleotídio causam uma modificação no quadro de leitura, resultando em uma proteína com uma sequência de aminoácidos diferente após a mutação, ou a uma proteína terminada prematuramente se um códon de término surgir no quadro (mutação sem sentido) (Tabela 34.2).

Tabela 34.2

O efeito de mutações em uma única base

Descrição da mudança na sequência genética	Sequência do mRNA	Sequência da proteína	Resultado da mudança
Gene normal	AUG GGG AAU CUA UCA CCU GAU C…	Met-Gly-Asn- Leu-Ser-Pro-Asp-…	Proteína normal
Inserção de um C	AUG GGC GAA UCU AUC ACC UGA UC…	Met-Gly-Glu- Ser-Ile-Thr-Término	Término prematuro
Deleção de um A	AUG GGG AAU CUA UCC CUG AUC…	Met-Gly-Asn- Leu-Ser-Leu-Ile-…	Sequência diferente
Substituição de UC por CG	AUG GGG AAU CUA CGA CCU GAU C…	Met-Gly-Asn- Leu-Arg-Pro-Asp-…	Substituição
Substituição de um A por um G	AUG GGG AAU CUG UCA CCU GAU C…	Met-Gly-Asn- Leu-Ser-Pro-Asp-…	Nenhuma mudança (silenciosa)
Substituição de um G por um C	AUG GGG AAU CUA UGA CCU GAU C…	Met-Gly-Asn- Leu-Término	Término prematuro

Mutações em um gene são transcritas para o mRNA, e as mudanças resultantes na sequência da proteína estão ilustradas. Note que, dependendo da posição da mutação, substituições de um único nucleotídio podem resultar em **mudanças silenciosas**, em uma troca de um único aminoácido **(sentido trocado)** ou até em término prematuro **(sem sentido)**.

A maquinaria de síntese proteica

O ribossomo é uma linha de montagem em vários passos para a síntese proteica

Ribossomos, as máquinas moleculares que conduzem a síntese proteica, consistem em uma subunidade pequena e uma grande que, quando associadas uma à outra, possuem três sítios específicos onde se ligam os tRNAs. Esses sítios são conhecidos como aminoacil-tRNA ou sítio A, peptidil-tRNA ou sítio P e sítio de saída ou sítio E. O sítio A é onde a molécula de tRNA doadora, carregando o aminoácido apropriado em sua haste aceptora, é posicionada antes de aquele aminoácido ser incorporado na proteína. O sítio P é o local no ribossomo que contém a molécula de tRNA com o polipeptídio aminoterminal da proteína recém-sintetizada ainda acoplado por meio de seu terminal carboxila à sua haste aceptora. É dentro desses sítios que ocorre o processo de formação das ligações peptídicas. Esse processo é catalisado por uma atividade de peptidil transferase, a qual forma as ligações peptídicas entre o grupamento amino do aminoácido no sítio A e o terminal carboxila do peptídio em formação acoplado ao tRNA no sítio P. O sítio E é para onde o tRNA desacilado se desloca uma vez que a ligação peptídica é formada e vai sair em breve do ribossomo. O sítio E, que fornece um terceiro sítio de interação entre o tRNA e o mRNA nos ribossomos, parece ser essencial para manter o quadro de leitura e assegurar a fidelidade da tradução.

- Sítio A – tRNA doador-aminoácido
- Sítio P – tRNA-cadeia peptídica em crescimento

■ Sítio E – sítio ocupado pelo tRNA desacilado

Cada aminoácido tem uma sintetase específica que o acopla a todos os tRNAs que o codificam

Existe uma molécula de tRNA distinta para a maioria dos códons representados na Tabela 34.1. O aminoácido é acoplado à haste aceptora do tRNA por uma enzima chamada aminoacil-tRNA sintetase. Essa enzima catalisa a formação de uma ligação éster entre o grupamento hidroxila 3′ do nucleotídio adenosina e o grupamento carboxila do aminoácido (Fig. 34.1). O acoplamento de um aminoácido ao tRNA é uma reação em dois estágios. Primeiro o grupamento carboxila do aminoácido é ativado por uma reação com o trifosfato de adenosina (ATP) para formar um intermediário aminoaciladenilato, o qual se liga ao complexo da sintetase. A enzimologia da ativação do grupamento carboxila dos aminoácidos é similar à da ativação de ácidos graxos pela tiocinase (Cap. 15), mas, em vez de transferir o grupamento acil para o grupamento tiol da coenzima A, o grupamento aminoacil é transferido para o grupamento hidroxila 3′ do tRNA. O produto é descrito como uma molécula de **tRNA carregada**. Nesse estágio ele está pronto para se ligar ao sítio A do ribossomo, onde ele vai contribuir com seu aminoácido para uma cadeia peptídica em crescimento. Existe uma sintetase específica para cada um dos 20 aminoácidos em proteínas. Essa sintetase acopla o aminoácido apropriado a todos os tRNAs que se liguem àquele aminoácido.

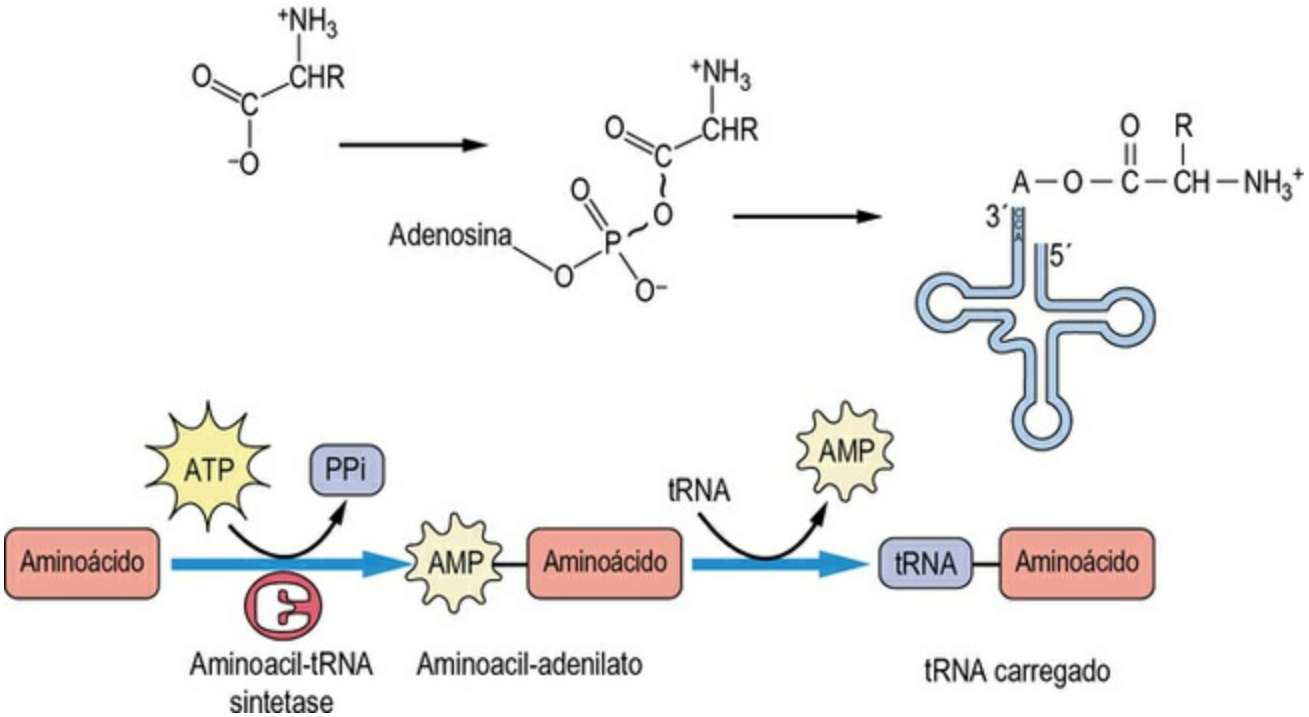


FIG. 34.1 Ativação de um aminoácido e acoplamento ao seu tRNA cognato. O aminoácido deve ser ativado por uma aminoacil-tRNA sintetase para formar um intermediário aminoacil-adenilato, antes que ele seja acoplado à extremidade 3’ do tRNA. AMP, monofosfato de adenosina; PPi, pirofosfato inorgânico.

Existe certa flexibilidade no pareamento da posição 3′ do códon de mRNA

A interação do tRNA carregado com seu códon relacionado é efetuada pela associação da alça de anticódon no tRNA ao códon no mRNA pela ligação de hidrogênio entre os pares de bases complementares (Fig. 34.2). As regras do pareamento de bases são as mesmas daquelas para o DNA (Cap. 32), exceto na terceira posição, ou base 3′, do códon. Nessa posição, pares de base não usuais podem se formar entre esse nucleotídio e o primeiro, ou base 5′, do anticódon. A chamada **hipótese da oscilação** do pareamento códon-anticódon permite a um tRNA que possui um anticódon que não é perfeitamente complementar ao códon de mRNA reconhecer a sequência e, também, a incorporação de aminoácidos na cadeia peptídica em crescimento. Assim, se um resíduo de guanina está na posição 5′ do anticódon, ele pode formar um par de bases com um resíduo de citosina ou uma uracila na posição 3′ do códon. Se o resíduo de adenosina modificado, inosina, aparece na posição 5′ do anticódon, ele pode formar um par de bases com uma uracila, adenosina ou até citosina na posição 3′ do códon (Tabela 34.3). Isso permite que um tRNA com o anticódon GAG decodifique os códons CUU e CUC, ambos codificando uma leucina. A oscilação fornece um mecanismo para lidar eficientemente com a degeneração do código genético, uma vez que a degeneração sempre ocorre no terceiro resíduo do códon.

Tabela 34.3

As possibilidades de pareamento de bases entre a terceira posição do nucleotídio 3’ do códon do mRNA e a primeira posição ou nucleotídio 5’ do anticódon do tRNA

Códon, terceira posição ou 3′ (mRNA)	Anticódon, primeira posição ou 5′ (tRNA)
G	C
U	A
A ou G	U
C ou U	G
A ou C ou U	I

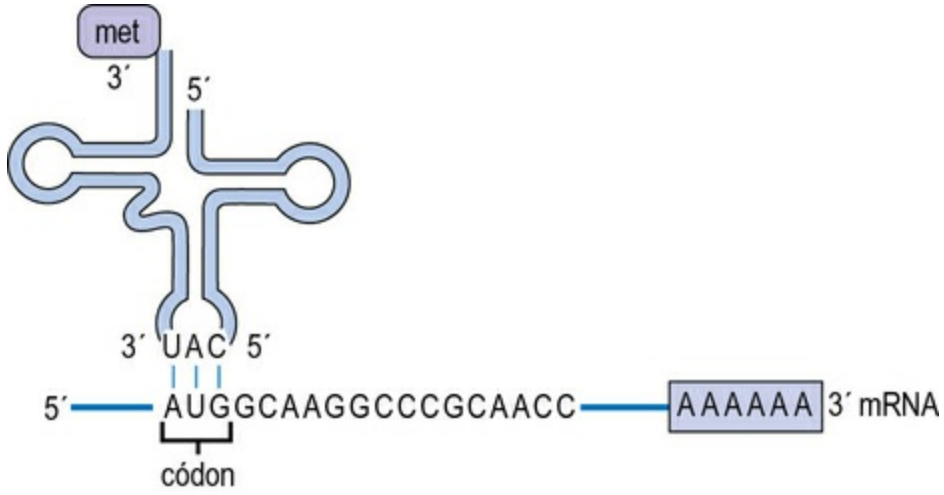


FIG. 34.2 Interação do tRNA carregado com o mRNA. A interação de um tRNA carregado com um mRNA ocorre pelo pareamento das bases complementares na alça de anticódon e no códon do mRNA.

Quadro de conceitos avançados

Fidelidade da tradução

Aminoacil-tRNA sintetases têm habilidade de verificar erros

Para garantir a precisão da síntese proteica, houve uma evolução de mecanismos que asseguram a seleção do aminoácido correto para a acilação e de edição de erros de tRNAs já carregados. Um desses mecanismos é encontrado nas enzimas responsáveis pelo acoplamento de um aminoácido ao tRNA correto. As aminoacil-tRNA sintetases têm a capacidade de não só discriminar entre aminoácidos antes que eles sejam acoplados ao tRNA apropriado, mas também de remover aminoácidos acoplados ao tRNA errado. Além disso, essas enzimas devem discriminar entre uma diversidade de tRNAs e serem capazes de parear o tRNA correto com o aminoácido apropriado. Essas capacidades apresentadas pelas sintetases são realizadas por uma série de ligações de hidrogênio entre a enzima e o aminoácido e entre a enzima e o tRNA. Esses mecanismos se combinam para assegurar a transferência acurada da informação do mRNA para a proteína.

Como o ribossomo sabe onde começar a síntese proteica?

A molécula de mRNA carrega a informação que será usada para dirigir a síntese da proteína, no entanto nem toda a informação contida no mRNA é utilizada para esse propósito. A maioria dos mRNAs eucarióticos possui regiões tanto antes quanto depois da região que codifica a proteína, chamadas de **sequências flanqueadoras** 5′ e 3′ ou *untranslated regions* ou regiões não traduzidas (UTRs) 5′ e 3′. Essas sequências estão envolvidas na regulação do sítio e da taxa de síntese proteica e na estabilidade do mRNA. Deste modo, a região que codifica a proteína não começa imediatamente no início do mRNA, o que levanta a questão de como o ribossomo sabe por onde iniciar a síntese. No caso das células eucarióticas, o ribossomo primeiro se liga à estrutura cap 7-metilguanina

(Cap. 33) na extremidade 5′ do mRNA e então se move ao longo da molécula até encontrar o primeiro códon AUG (Fig. 34.3). Isso sinaliza que o ribossomo deve começar a sintetizar a proteína, iniciando com um resíduo de metionina, e continuar até encontrar um dos códons de término. Em alguns mRNAs virais e eucarióticos o primeiro AUG não é utilizado e, em vez disso, um códon de início alternativo é definido por um sítio de entrada interno do ribossomo (IRES, do inglês *internal ribossome entry site;* Fig. 34.3).

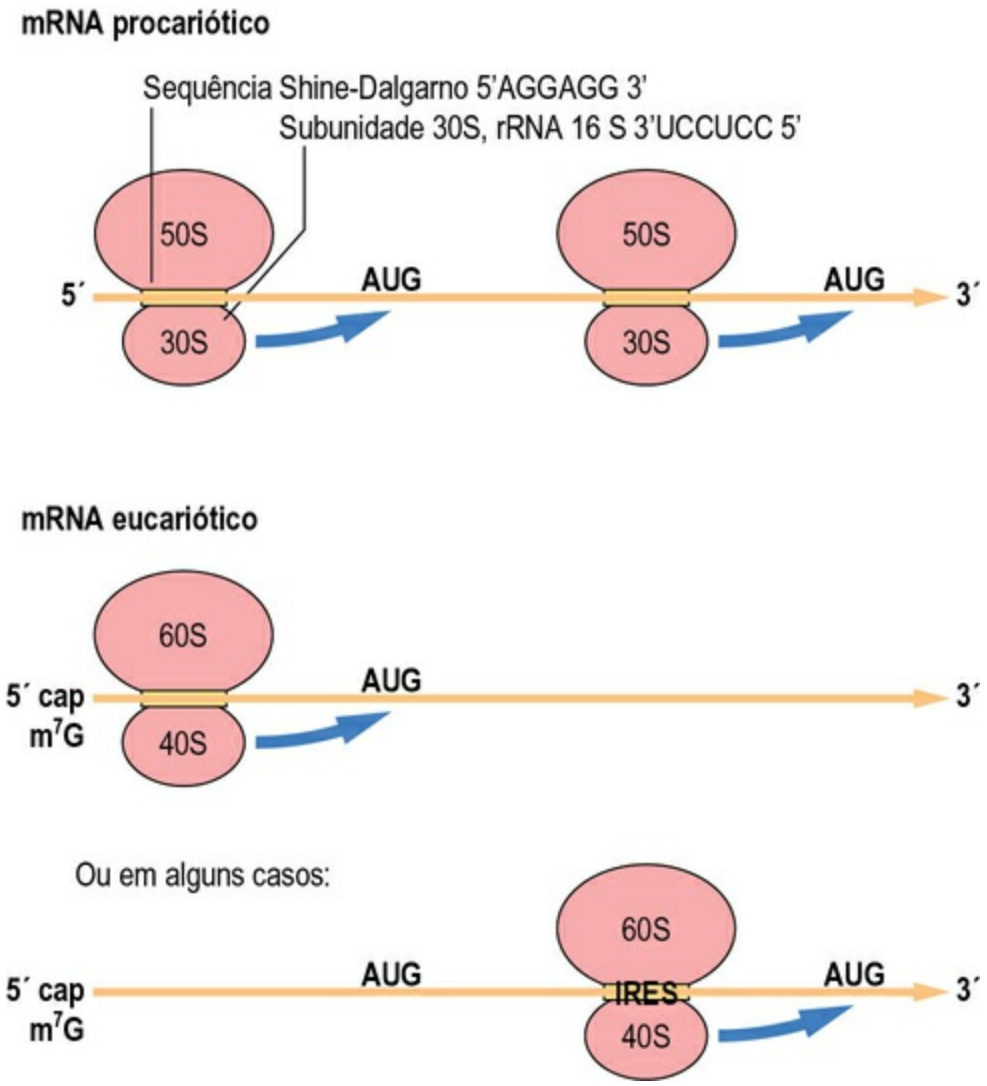


FIG. 34.3 Encontrando a região que codifica uma proteína. O ribossomo se liga ao mRNA antes de localizar a região que codifica a proteína. Ribossomos bacterianos (uma porção do rRNA 16 S) se ligam a sequências complementares no mRNA chamadas de sequências Shine-Dalgarno, que ficam próximo ao início da região que codifica a proteína. Ribossomos eucarióticos se ligam ao cap 5' dos mRNAs e, então, se movem ao longo do mRNA até encontrarem o primeiro códon AUG ou, em poucos casos, eles se ligam internamente a um sítio de entrada interno do ribossomo (IRES) e, então, se deslocam para o AUG.

No caso das células bacterianas, não existe cap m^7G. Saber qual é a porção do mRNA a ser utilizada para sintetizar uma proteína é complicado pelo fato de poder haver várias proteínas codificadas por um único mRNA, cada uma independente da outra, permitindo que proteínas de sequências diferentes sejam obtidas da mesma sequência ribonucleica. Esse problema foi resolvido com a descoberta de uma sequência no mRNA que ajuda a posicionar o ribossomo precisamente no início de cada região que codifica

uma proteína. Essa sequência, conhecida como **sequência Shine-Dalgarno**, é encontrada na maioria dos mRNAs bacterianos e é complementar à porção 16 S do rRNA na subunidade ribossomal pequena da bactéria (Fig. 34.3). Pela formação de ligações de hidrogênio o ribossomo é então posicionado no início de cada região que codifica para uma proteína.

O processo da síntese proteica

A tradução é um processo dinâmico que envolve a interação de enzimas, tRNAs, ribossomos e rRNAs, fatores de tradução e mRNA

A tradução é normalmente dividida em três estágios:

- iniciação;
- alongamento;
- terminação.

Iniciação

A síntese de uma proteína é iniciada no primeiro códon AUG (metionina) no mRNA

O início da síntese proteica em eucariotos ocorre quando uma pequena subunidade dissociada do ribossomo forma um complexo com fatores de iniciação eucarióticos (eIF, do inglês *eukaryotic initiation factors*), eIF-1, eIF-1 A e eIF-3, que se ligam a um complexo eIF-2/Met-tRNA. Esse **complexo pré-iniciação** é direcionado para a extremidade 5′ do mRNA ao ligar o eIF-4F, e outros fatores, ao cap 5′. O complexo explora o mRNA até localizar o primeiro códon AUG, utilizando ATP para potencializar este processo. A subunidade ribossomal grande então se liga ao complexo da subunidade pequena/Met-tRNA/mRNA, e a Met-tRNA é por fim direcionada para o sítio P (Fig. 34.4), um processo que requer a eIF-5, hidrolisando trifosfato de guanosina (GTP) e liberando os fatores de iniciação. Em células eucarióticas, existem pelo menos 12 fatores de iniciação diferentes. Em células procarióticas, o processo envolve três fatores de iniciação e o complexo de iniciação se forma pela primeira vez imediatamente antes da porção 5′ da região codificante, como resultado da interação do rRNA 16 S na subunidade ribossomal pequena com a sequência Shine-Dalgarno no mRNA. A N-formil metionina (fmet), codificada por AUG, é o primeiro aminoácido em todas as proteínas bacterianas, em vez de metionina.

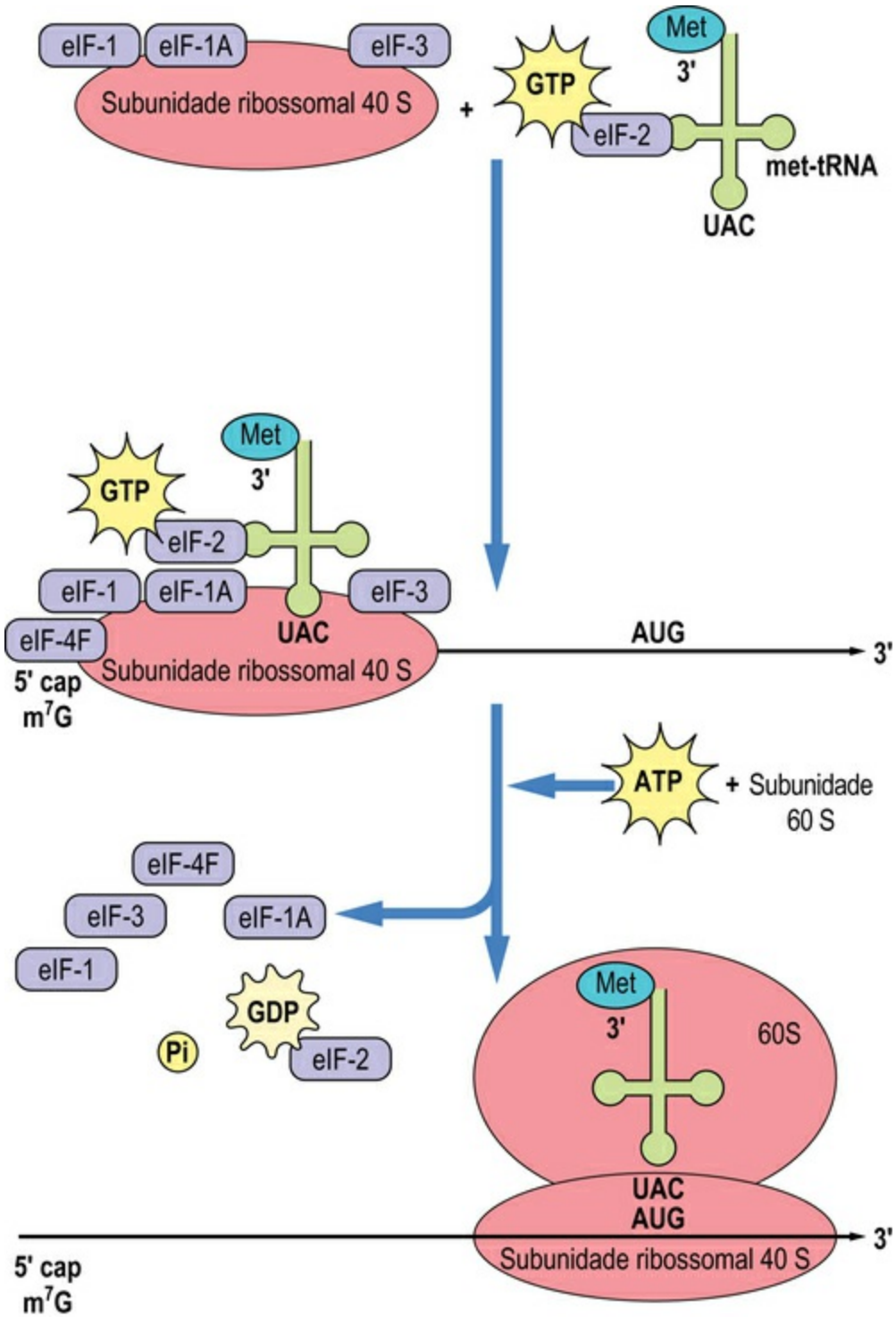


FIG. 34.4 Iniciação da síntese proteica em células eucarióticas. A subunidade ribossomal 40 S com os fatores de iniciação eIF-1, eIF-1 A e eIF-3 ligados a ela, o mRNA com o eIF-4 ligado ao cap 5' e o met-tRNA ligado ao eIF-2 são aproximados. Uma vez que esses componentes são montados, o complexo se desloca até o AUG, explorando a sequência de mRNA e hidrolisando ATP no processo. A subunidade ribossomal 60 S completa o complexo de iniciação e, no processo, os fatores de iniciação são liberados. Note que, na iniciação, o sítio P é ocupado pelo met-tRNA iniciador, como mostrado na Figura 34.5. GDP, difosfato de guanosina; eIF, fator de iniciação da tradução eucariótica.

Alongamento

Os fatores envolvidos no estágio de alongamento da síntese proteica são alvo de alguns antibióticos

Uma vez que a iniciação foi completada, o processo de tradução da informação no mRNA em uma proteína funcional se inicia. O alongamento começa com a ligação do tRNA carregado ao sítio A do ribossomo. Em células eucarióticas, a molécula de tRNA carregada é levada ao ribossomo pela ação do fator de alongamento chamado eEF-1A (Fig. 34.5). Para que o eEF-1A esteja ativo ele precisa estar associado a uma molécula de GTP. Se o tRNA carregado for correto, no qual o seu anticódon forma pares de bases com o códon do mRNA, então o GTP é hidrolisado e o eEF-1A, liberado. Para que o fator eEF-1A leve outra molécula de tRNA carregada para o ribossomo, ele deve ser regenerado por um fator de alongamento chamado eEF-1B, que promoverá a associação entre eEF-1A e GTP para que ele possa se ligar a outra molécula de tRNA carregada (Fig. 34.5). Uma vez que a molécula correta de tRNA carregado tenha sido entregue ao sítio A do ribossomo, a atividade **peptidil transferase** do ribossomo catalisa a formação da ligação peptídica entre o aminoácido no sítio A e o aminoácido na extremidade final da cadeia peptídica crescente no sítio P. O complexo tRNA-cadeia peptídica está agora transientemente ligado ao sítio A. O ribossomo é então deslocado um códon à frente no mRNA (em direção à extremidade 3′), com a ajuda de um fator conhecido como eEF-2, e o tRNA no sítio A, com a cadeia peptídica em formação ligada a ele, se desloca em direção ao sítio P. O tRNA descarregado originalmente no sítio P se desloca para o sítio E de modo que se tenha um total de nove pares de nucleotídios envolvidos na estabilização do complexo ribossomo-mRNA-tRNA. O processo todo se repete para a adição do próximo aminoácido (Fig. 34.6). Os mecanismos deste processo complexo são idênticos em células procarióticas, mas os ribossomos e os fatores são diferentes e isso ajuda a explicar a utilidade de antibióticos que inibem preferencialmente a síntese proteica em bactérias (Tabela 34.4).

Tabela 34.4

Antibióticos selecionados que afetam a síntese de proteínas

Antibiótico	Alvo
Tetraciclina	Sítio A do ribossomo bacteriano
Estreptomicina	Subunidade 30 S do ribossomo bacteriano
Eritromicina	Subunidade 50 S do ribossomo bacteriano
Cloranfenicol	Peptidil transferase do ribossomo bacteriano
Puromicina	Leva ao término prematuro
Ciclo-heximida	Ribossomo eucariótico 80 S

Observe que a ciclo-heximida é tóxica para os seres humanos.

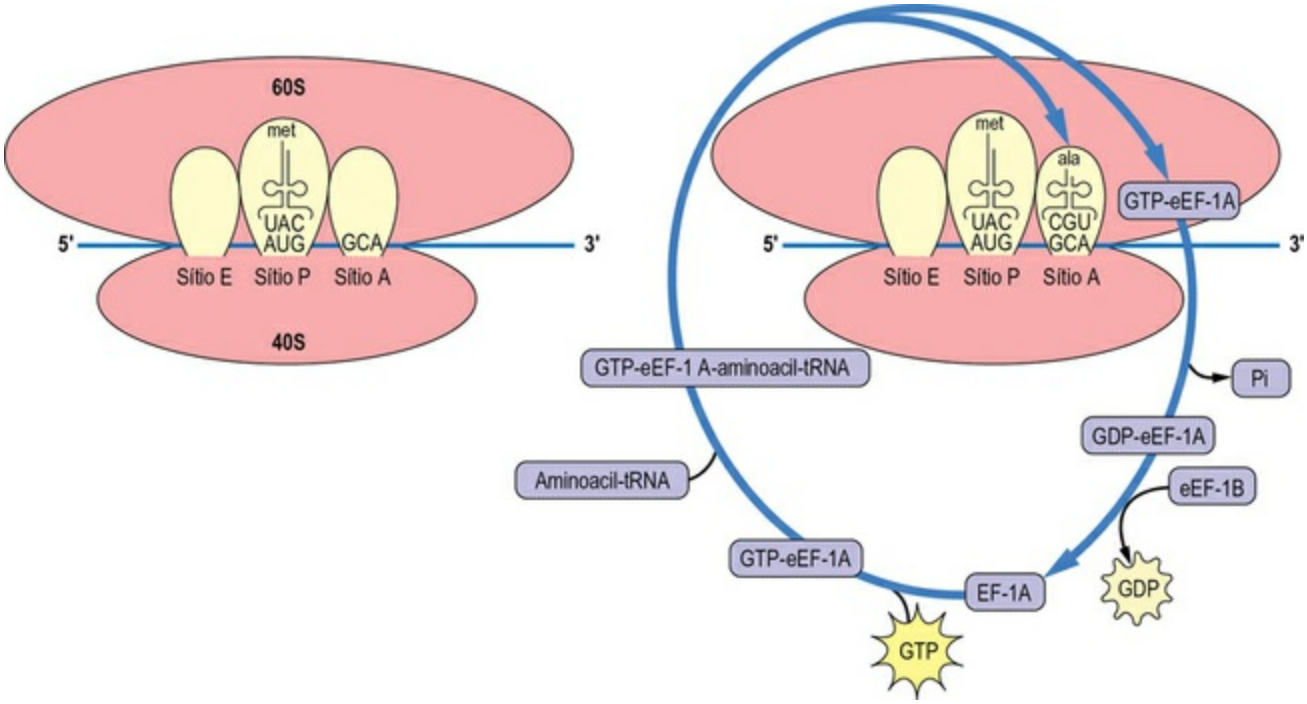


FIG. 34.5 Reciclagem do fator de alongamento eEF-1A. Uma molécula de tRNA carregado é levada ao sítio A do complexo de iniciação, com a ajuda do eEF-1A ligado ao GTP, para iniciar o processo de alongamento. O fator é liberado uma vez que o GTP é hidrolisado e o processo de reciclagem do eEF-1A é auxiliado pelo fator de troca eEF-1B. Cada adição sucessiva de aminoácido requer que uma molécula de tRNA corretamente carregado seja levada ao sítio A do ribossomo; ala, alanina; Pi, fosfato inorgânico.

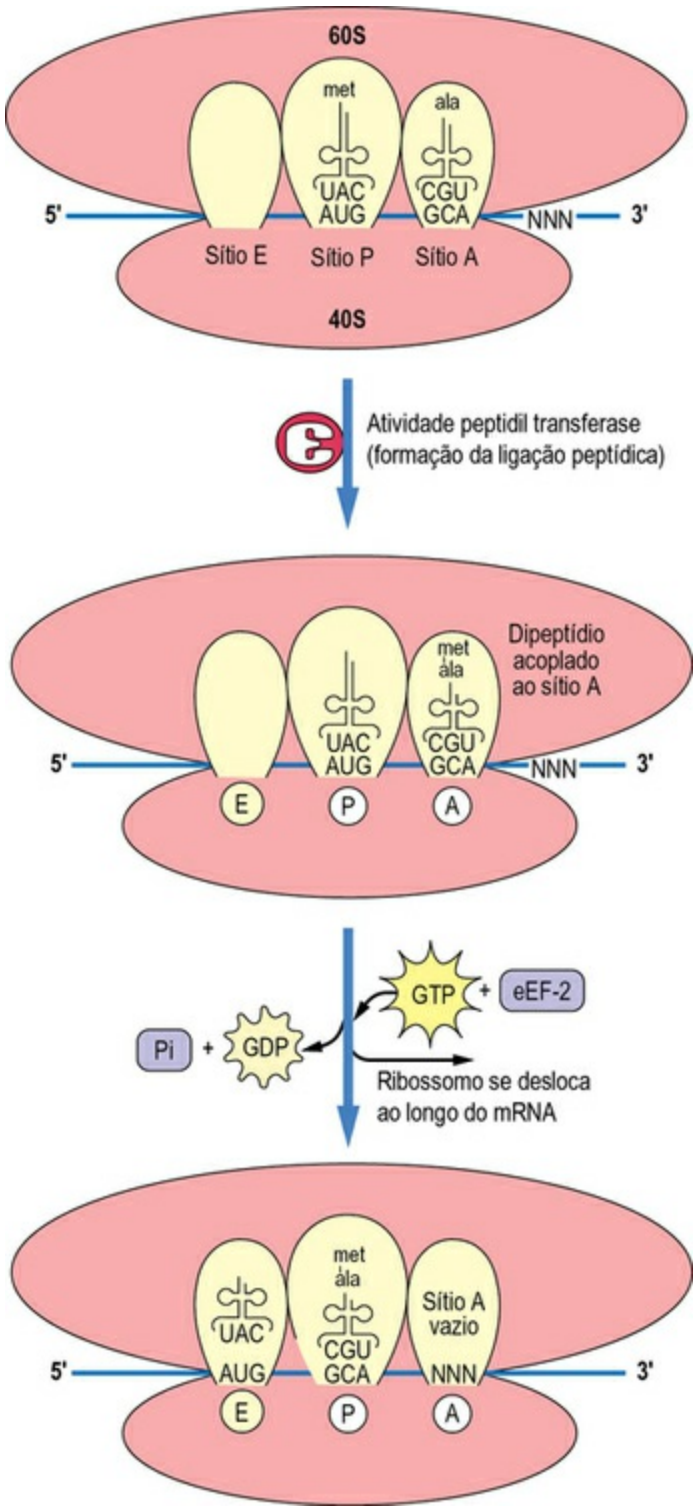


FIG. 34.6 Formação da ligação peptídica e translocação. A formação da ligação peptídica entre cada aminoácido sucessivo é catalisada pela peptidil transferase. Uma vez que a ligação peptídica esteja formada, um fator de alongamento (eEF-2 nesse caso) se desloca um códon à frente no mRNA para que o sítio A fique vazio e pronto para receber o próximo tRNA carregado. O sítio E se encontra agora ocupado pelo tRNA não carregado (met). NNN é o códon para o próximo aminoácido.

Terminação

A terminação da síntese proteica tanto em células eucarióticas quanto bacterianas ocorre quando o sítio A do ribossomo alcança um dos códons de término do mRNA. As proteínas chamadas fatores de liberação reconhecem esses códons e levam à liberação da proteína acoplada à última molécula de tRNA (Fig. 34.7). Esse processo é uma reação que

depende de energia e é catalisada pela hidrólise de GTP, que transfere uma molécula de água para a extremidade final da proteína, assim liberando-a do tRNA. Após a liberação da proteína recém-sintetizada, as unidades ribossomais, o tRNA e o mRNA se dissociam, permitindo a tradução de uma nova molécula de mRNA.

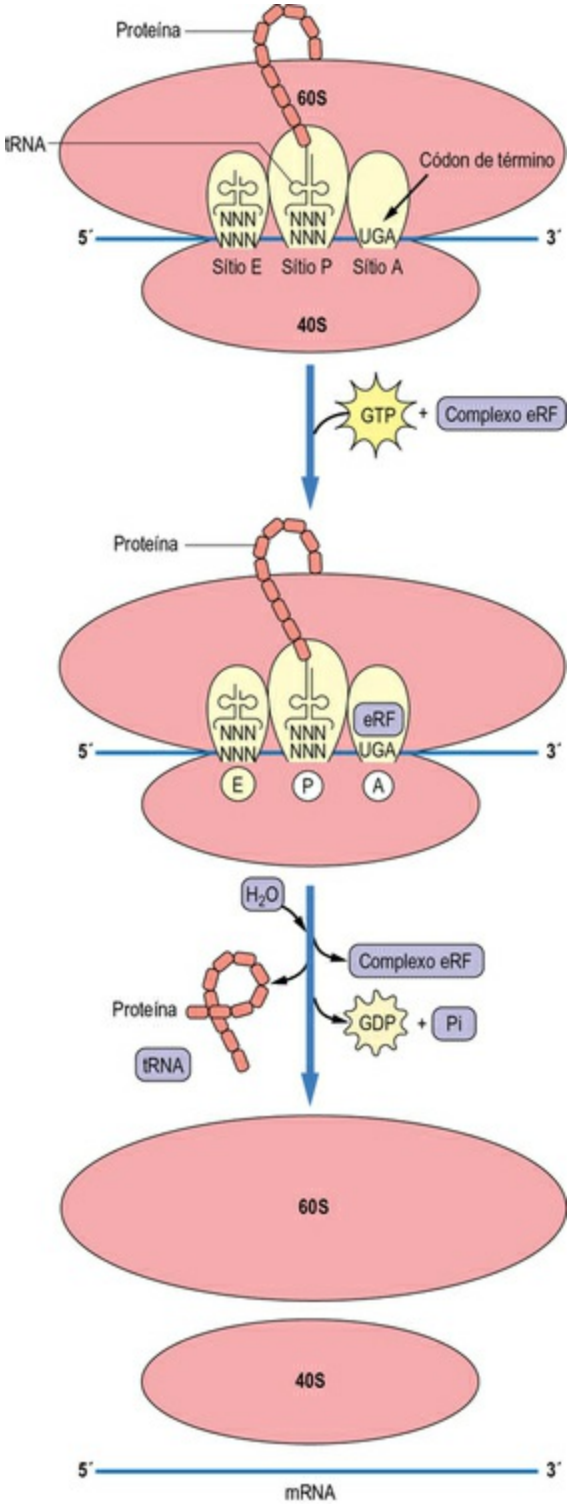


FIG. 34.7 Terminação da síntese proteica. A terminação da síntese proteica ocorre quando o sítio A está localizado sobre um códon de término. Um complexo de fatores de liberação (eRF), com o eRF-1 no sítio A, leva à liberação da proteína completa e à dissociação de ribossomo, mRNA e tRNA para que estes possam iniciar outro ciclo de tradução.

Enovelamento proteico e estresse do retículo endoplasmático (RE)

O estresse do RE, resultante de erros no enovelamento proteico, evolui para muitas condições crônicas, incluindo a obesidade, o diabetes e o câncer

Para uma proteína recém-sintetizada se tornar funcionalmente ativa, ela deve se enovelar em uma estrutura tridimensional única. Dado que as proteínas recém-sintetizadas podem possivelmente adotar excessivas conformações aleatórias, elas obtêm suas estruturas nativas com o auxílio de uma classe de proteínas chamadas **chaperonas**. As chaperonas promovem enovelamento, montagem e organização corretos de proteínas e estruturas macromoleculares, incluindo o nucleossomo e os complexos de transporte de elétrons. No RE, elas se ligam a regiões hidrofóbicas de proteínas desenoveladas, evitando o enovelamento incorreto de proteínas e a formação de agregados não específicos, protegendo as superfícies em interação. As chaperonas promovem o correto enovelamento de proteínas recém-sintetizadas por ciclos de ligação e liberação da proteína (substrato) regulados por uma atividade ATPase e por proteínas cofatoras. As **proteínas de choque térmico** são um grupo de proteínas chaperonas expressas pelas células em resposta a elevadas temperaturas; elas ajudam no re-enovelamento de proteínas desnaturadas, não só como resultado do calor, mas também em resposta a estresses físicos e químicos. A proteína regulada pela glicose 78/proteína de ligação a imunoglobulina (**GRP78/BiP**) liga e aprisiona proteínas mal enoveladas no RE, evitando seu transporte e secreção subsequentes. As proteínas são então direcionadas para a **via de degradação associada ao RE (ERAD)**, que facilita a exportação para o citosol e a degradação proteassomal (ver adiante) da proteína mal enrolada.



Quadro clínico

Um paciente a quem foi prescrito um antibiótico e que não aderiu ao tratamento

Um jovem que você estava tratando de uma infecção por sinusite retorna ao seu consultório após uma semana, ainda reclamando de dores de cabeça e congestão nasal. Ele explica que começou a se sentir melhor mais ou menos três dias após começar a tomar o antibiótico tetraciclina, que você prescreveu. Você pergunta se ele continuou a tomar a dose total do medicamento, mesmo após começar a se sentir melhor. Ele admite relutantemente que, assim que começou a se sentir melhor, parou de tomar o medicamento. Como você explicaria para o seu paciente que é importante que ele tome o medicamento pelo tempo que você prescreveu, mesmo que ele comece a se sentir melhor logo após poucos dias de tratamento?

Comentário

Como médico, você sabe que a tetraciclina é um antibiótico de amplo espectro que

inibe a maquinaria de síntese proteica de células bacterianas se ligando ao sítio A do ribossomo (Tabela 34.4). Você também sabe que, se o medicamento é removido, a síntese proteica pode recomeçar. Se o medicamento não for tomado por todo o período recomendado, as bactérias podem voltar a crescer, levando à ressurgência da infecção. Além disso, aquelas bactérias que começam a crescer após o término prematuro do tratamento são provavelmente as que possuem maior resistência ao medicamento. Por causa da seleção de cepas mutantes mais resistentes, a infecção secundária provavelmente será mais difícil de controlar.



Quadro de conceitos avançados

Síntese proteica: peptidil transferase

A peptidil transferase não é uma enzima típica. É uma ribozima

A enzima peptidil transferase possui a atividade responsável pela formação da ligação peptídica durante a síntese proteica. Essa atividade enzimática catalisa a reação entre o grupamento amino do aminoacil – tRNA no sítio A e o carbono carboxílico do peptidil-tRNA no sítio P, formando uma ligação peptídica de uma ligação éster. A atividade está localizada no ribossomo, mas nenhuma das proteínas ribossomais é capaz de catalisar essa reação. Estruturas cristalinas do ribossomo mostraram que o centro da peptidil transferase é composto inteiramente de rRNA e, apesar de as proteínas ou aminoácidos específicos serem importantes para posicionar os tRNAs ou estabilizar a estrutura do rRNA, a atividade catalítica reside no rRNA.

Uma condição conhecida como estresse do RE se desenvolve se a atividade das chaperonas e da ERAD for ultrapassada e agregados proteicos se acumularem no lúmen do RE (p. ex., como resultado de uma mutação proteica, uma deficiência de glicosil transferase ou seu inibidor, como a tunicamicina) (Fig. 27.11). O estresse do RE ativa a **resposta a proteínas não enoveladas (UPR)**, a qual induz maior expressão de várias proteínas chaperonas e da ERAD. Além disso, a proteína cinase do RE semelhante à proteína cinase do RNA (PERK) se oligomeriza e se autofosforila, fosforilando em seguida a eIF-2, que inibe a iniciação (Fig. 34.4) e diminui a velocidade de síntese de muitas proteínas. Se a homeostasia não for restabelecida pela UPR, a apoptose é eventualmente iniciada para eliminar a célula. Várias doenças humanas são caracterizadas por estresse do RE e pela UPR, incluindo algumas formas de fibrose cística e de retinite pigmentosa. O estresse do RE e a UPR também inibem a sinalização da insulina, causando resistência à insulina, e desempenham um papel no desenvolvimento de patologia na obesidade e no diabetes melito tipo 2 (Cap. 21).

Direcionamento de proteínas e modificações pós-traducionais

Direcionamento de proteínas

Um mRNA pode ter vários ribossomos ligados a ele em um dado momento, o que é conhecido como um **polirribossomo ou polissomo** (Fig. 34.8). Existem duas classes gerais de polissomos encontradas nas células: aqueles que estão livres no citoplasma e aqueles acoplados ao retículo endoplasmático. Os mRNAs que codificam proteínas destinadas ao citoplasma ou núcleo são traduzidos principalmente em polissomos livres no citoplasma, enquanto mRNAs que codificam proteínas de membrana e de secreção são traduzidos em polissomos acoplados ao RE. Regiões do RE cobertas com ribossomos são descritas como **retículo endoplasmático rugoso (RER).**

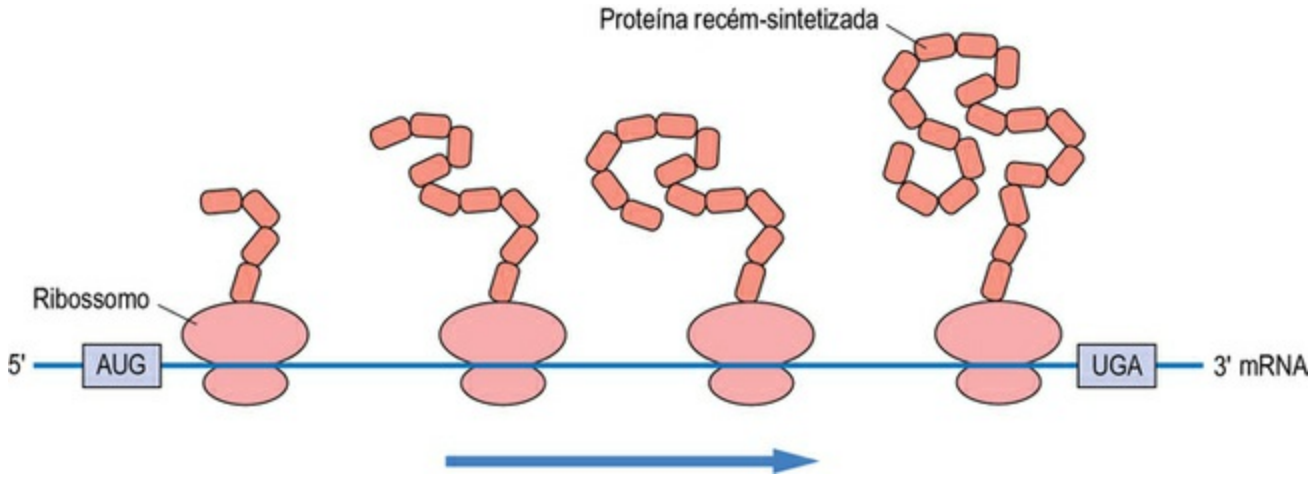


FIG. 34.8 Síntese de proteína nos polissomos. As proteínas podem ser sintetizadas por diversos ribossomos ligados a um mesmo mRNA, formando uma estrutura conhecida como polissomo.

O destino celular das proteínas é determinado por suas sequências peptídicas sinalizadoras

Proteínas destinadas a exportação, inserção na membrana ou a organelas celulares específicas devem ser distinguidas de alguma maneira de proteínas residentes no citoplasma. Essa característica distintiva das proteínas destinadas a esses locais é a presença de sequência sinalizadora geralmente compreendendo os primeiros 20-30 aminoácidos na porção aminoterminal da proteína. No caso de proteínas secretadas ou de membrana, logo após a síntese da sequência sinalizadora, esta é reconhecida por um complexo ribonucleoproteico conhecido como **partícula de reconhecimento de sinal** (**SRP**), composta por um RNA pequeno e seis proteínas. A SRP se liga à sequência sinalizadora e pausa a tradução do restante da proteína. Esse complexo então se liga ao receptor para SRP localizado na membrana do retículo endoplasmático. Depois que a SRP entrega o mRNA ligado ao ribossomo com sua proteína nascente para o retículo endoplasmático, a sequência sinalizadora é inserida através da membrana, a SRP se dissocia, e a tradução continua com o deslocamento da cadeia polipeptídica, à medida que é sintetizada, através da membrana para o espaço intersticial do retículo endoplasmático (Fig. 34.9). A proteína é então transferida para o complexo de Golgi e de lá para seu destino final.

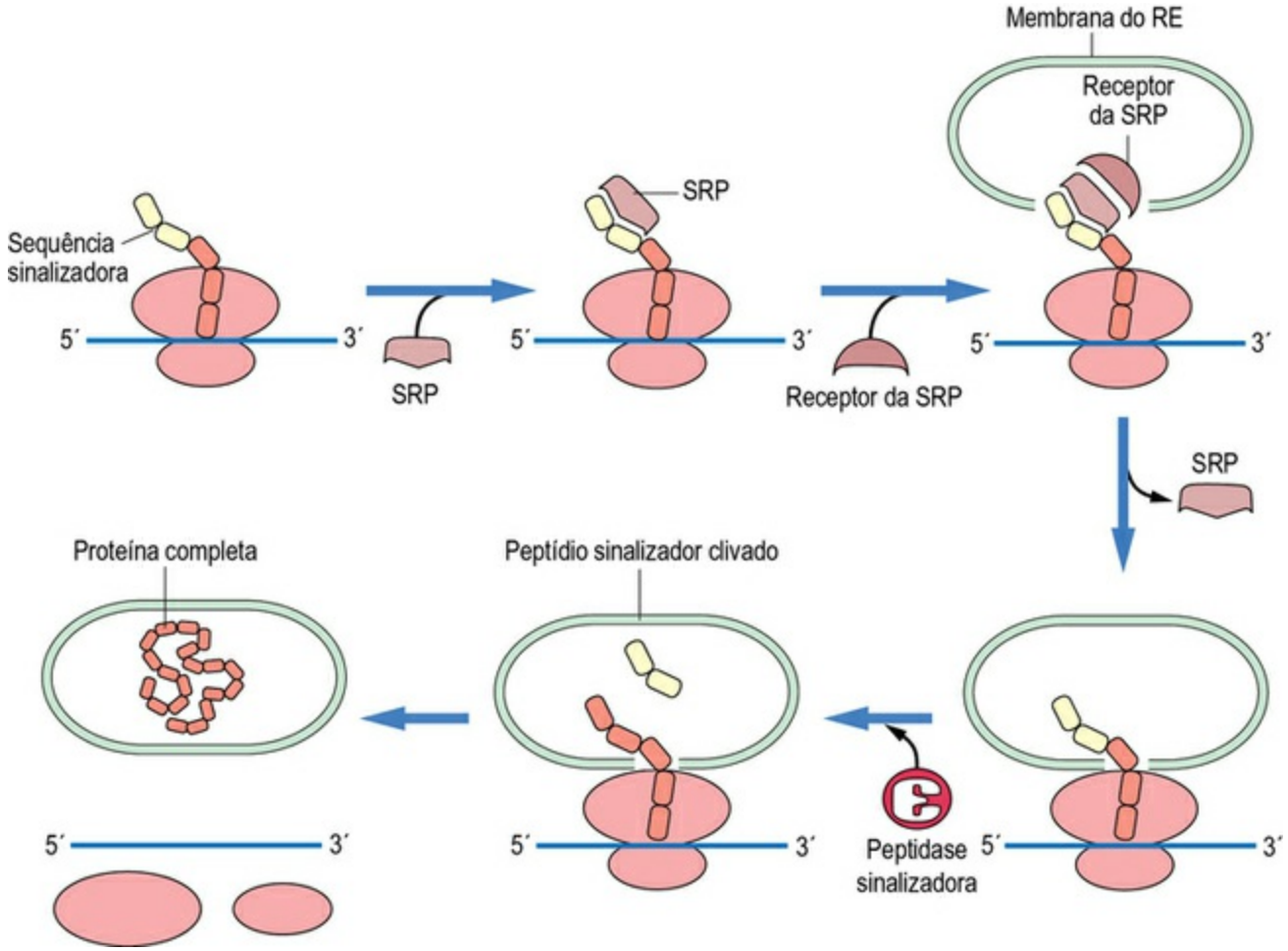


FIG. 34.9 Síntese de proteína no retículo endoplasmático. A sequência sinalizadora da proteína sendo traduzida é ligada a uma SRP, e este complexo é reconhecido pela proteína de ancoragem da SRP (receptor da SRP) no retículo endoplasmático (RE), onde a sequência sinalizadora é inserida através da membrana. Uma peptidase de sinal tipicamente remove a sequência sinalizadora, mas não em todas as proteínas. Uma vez concluída a síntese da proteína, esta é inserida nas membranas ou secretada.

Enquanto a Man-6-P em oligossacarídios ricos em manose é o sinal que direciona algumas glicoproteínas para o compartimento lisossomal (Fig. 27.14), o direcionamento de proteínas para outros compartimentos subcelulares é dirigido por uma sequência de peptídio sinal na cadeia peptídica. Diferentemente das proteínas secretadas ou de membrana, proteínas mitocondriais e nucleares são transportadas depois que a tradução está completa. No caso de proteínas destinadas para a mitocôndria, elas podem ter duas sequências sinalizadoras na sua porção *N*-terminal, dependendo se são destinadas à matriz ou ao espaço intermembranar. Proteínas mitocondriais devem ser desenoveladas antes de serem transportadas por transportadores nas membranas interna e externa (TMI e TME) (Fig. 9.3). Por sua vez, proteínas nucleares podem ter sinais de localização nuclear em qualquer parte da sequência da proteína, desde que expostas na superfície desta, e não precisam ser desenoveladas antes do transporte. Os poros nucleares são complexos muito grandes e podem acomodar o reconhecimento e transporte de uma proteína em seu estado nativo.

Modificações pós-traducionais

A maioria das proteínas requer modificação pós-traducional antes de se tornar biologicamente ativa

O retículo endoplasmático e o aparelho de Golgi são os principais locais de modificação pós-traducional das proteínas. No retículo endoplasmático, uma enzima chamada **peptidase sinalizadora** remove a sequência sinalizadora da porção aminoterminal da proteína, resultando em uma proteína madura que é 20-30 aminoácidos mais curta que a codificada pelo mRNA. No retículo endoplasmático e no complexo de Golgi, cadeias laterais de carboidrato são adicionadas e modificadas em sítios específicos na proteína (Cap. 27). Uma das modificações aminoterminais mais comuns em células eucarióticas é a remoção do resíduo de metionina aminoterminal que inicia a síntese da proteína. Finalmente, várias proteínas, como os hormônios insulina e glucagon, são sintetizadas como pré-proteínas e pró-proteínas que devem ser clivadas proteoliticamente para se tornarem ativas. A clivagem de um precursor em sua forma biologicamente ativa é geralmente realizada por uma protease específica e é um evento celular regulado.

Proteassomas: maquinaria celular para a reciclagem de proteínas

Diferentemente do DNA, proteínas não são reparadas, mas sim degradadas

A degradação de proteínas é um processo complexo que é crítico para a regulação celular. Existem diversas razões para que uma proteína precise ser degradada. A proteína simplesmente está desgastada – ela envelheceu passivamente por desnaturação gradual devido ao estresse ambiental normal. As proteínas também podem ser modificadas por reação com compostos intracelulares reativos, como intermediários glicolíticos, ou por reação com produtos da peroxidação lipídica durante o estresse oxidativo (Cap. 37). Outras proteínas podem ser parte de respostas celulares a hormônios ou, talvez, componentes do ciclo celular, ou são fatores de transcrição; elas precisam ser retiradas, às vezes rapidamente, para atenuar a resposta ou o sinal. Algumas dessas últimas proteínas possuem sequências de aminoácidos características ou resíduos *N*-terminais que promovem sua reciclagem rápida. A sequência **PEST (ProGluSerThr)** marca algumas proteínas para reciclagem rápida, enquanto proteínas como uma arginina *N*-terminal geralmente possuem uma meia-vida curta se comparadas com proteínas com uma metionina *N*-terminal.

O proteassoma é um complexo multicatalítico desenhado para a degradação de proteínas citosólicas

Como a degradação proteica é um processo destrutivo, ela deve ser confinada a organelas celulares específicas. Lisossomos, por exemplo, ingerem e degradam mitocôndrias danificadas e outras organelas membranosas. No entanto, proteínas citoplasmáticas mais solúveis são degradadas em estruturas chamadas proteassomas. O proteassoma 26 S (Fig. 34.10) consiste em dois tipos de subunidades: uma protease multicatalítica (MCP, do inglês *multicatalytic protease*) multimérica 20 S e uma ATPase 19 S. O proteassoma é uma

estrutura em forma de barril constituída pelo empilhamento de quatro anéis de sete monômeros homólogos, subunidades tipo α nas porções externas e subunidades tipo β nos anéis internos do barril. A atividade proteolítica – três tipos diferentes de treonina protease – se encontram nas subunidades β com os sítios ativos virados para dentro do barril, protegendo assim as proteínas citoplasmáticas de degradação não apropriada. As subunidades de ATPase estão acopladas a qualquer uma das extremidades do barril e agem como porteiros, permitindo que somente proteínas destinadas à degradação entrem no barril. As proteínas são desenoveladas em um processo que requer ATP e degradadas pela atividade das proteases em pequenos peptídios, de 6-9 aminoácidos de comprimento, que são liberados no citoplasma para o restante da degradação.

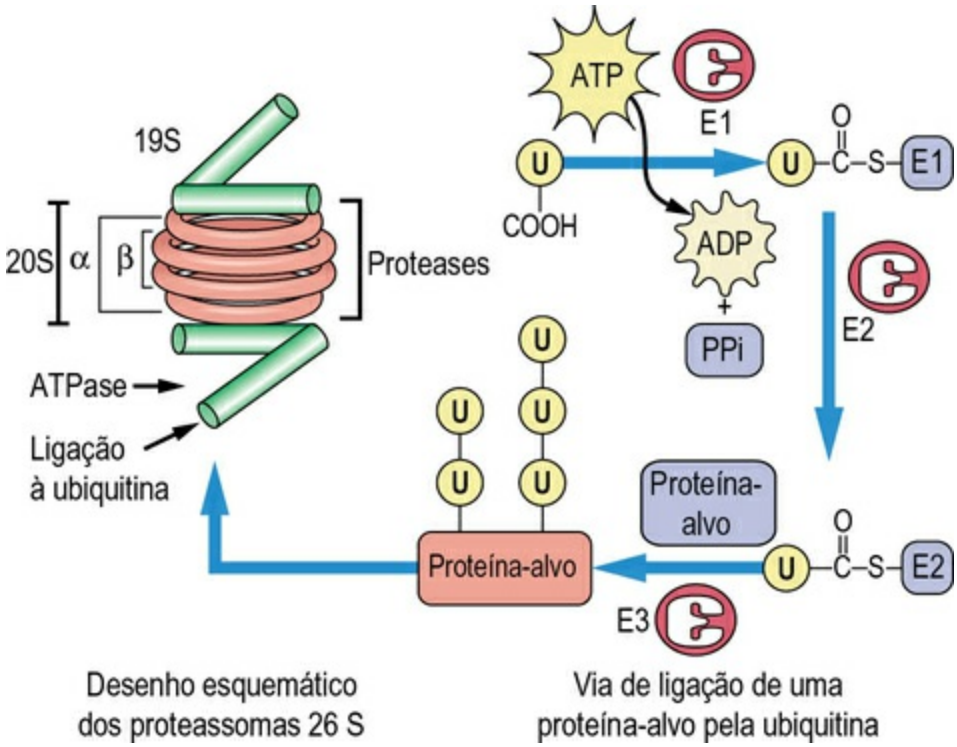


FIG. 34.10 Estrutura do proteassoma e o papel da ubiquitina (U) na reciclagem de proteína. O proteassoma é apresentado à esquerda, uma estrutura em forma de barril. A protease multicatalítica 20 S nos anéis do meio do barril possui atividade de protease voltada para a face interna. Os caps 19 S na extremidade do barril possuem atividade ligadora e desligadora de ubiquitina e atividade de ATPase controlando o acesso de proteínas ao interior do barril para degradação. O ciclo da ubiquitina está envolvido na marcação de proteínas para degradação pelo proteassoma. A ubiquitina é inicialmente ativada como um derivado tioéster da enzima ativadora de ubiquitina E1; ela é, então, transferida para a enzima conjugadora de ubiquitina E2 e, em seguida, para um resíduo de lisina na proteína-alvo, catalisada pela ubiquitina ligase E3. A ubiquitina é frequentemente copolimerizada nas proteínas-alvo. Quanto mais ubiquitinada estiver a proteína, mais suscetível ela será à degradação proteassômica. Note que o desenho não está em escala; o proteassoma é um complexo macromolecular de 26 S (≥ 2.000.000 Da); as proteínas-alvo são menores enquanto a ubiquitina é menor que 10.000 Da.

A ubiquitina direciona proteínas para a degradação no proteassoma

Proteínas destinadas à destruição são dirigidas para o proteassoma principalmente por modificação covalente com um proteína com 76 resíduos de aminoácidos, altamente conservada, chamada ubiquitina, que é encontrado em todas as células. A ubiquitina

deve ser ativada para cumprir seu papel (Fig. 34.10), o que é realizado por uma enzima ativadora de ubiquitina chamada E1. A ativação ocorre quando a E1 é acoplada por meio de uma ligação tioéster à porção *C*-terminal da ubiquitina pela formação de um intermediário ubiquitina-adenilato impulsionada por ATP. A ubiquitina ativada é então acoplada a uma ubiquitina carreadora de proteína, conhecida como E2, por uma ligação tioéster. Uma proteína ligase de ubiquitina conhecida como E3 transfere a ubiquitina de E2 para a proteína-alvo, formando uma **ligação isopeptídica** entre o terminal carboxila da ubiquitina e o grupo amino ε de um resíduo de lisina na proteína-alvo. Proteínas desnaturadas e oxidadas são geralmente ubiquitinadas por esse mecanismo. A subunidade 19 S do proteassoma possui um sítio ligador de ubiquitina que permite que a proteína covalentemente acoplada à ubiquitina entre no barril; a ubiquitina é então liberada por uma atividade de ubiquitinase e reciclada para o citosol para novo uso. A polimerização da ubiquitina em proteínas-alvo (**poliubiquitinação**) (Fig. 34.10) aumenta significativamente a degradação da proteína.

A via de ubiquitina que leva à degradação proteassômica das proteínas é complexa. Apesar de o número de enzimas E1 ser tipicamente pequeno, existem várias proteínas E2 e E3 com diferentes alvos específicos, havendo seis atividades ATPásicas diferentes associadas à subunidade 19 S do proteassoma. Considera-se que as ATPases estejam envolvidas na desnaturação de proteínas ubiquitinadas, abrindo o cerne proteolítico e transportando a cadeia peptídica para o cerne do proteassoma. Todas essas variações em componentes da via, assim como alterações durante o ciclo celular e em resposta à estimulação hormonal, providenciam uma via flexível e regulada para o *turnover* proteico.



Quadro de conceitos avançados

Inibindo o proteassoma para tratar o câncer

O mieloma múltiplo é um câncer de células plasmáticas (linfócitos B) que são normalmente encontradas nos ossos e sintetizam anticorpos como parte do sistema imune (Cap. 2). O crescimento descontrolado dessas células plasmáticas resulta em anemia, tumores nos ossos, uma resposta imune comprometida e, infelizmente, um prognóstico ruim. Pacientes com mieloma múltiplo recorrente possuem poucas opções de tratamento, mas um novo fármaco, que é um inibidor da atividade proteolítica do proteassoma, o bortezomib, foi adicionado ao arsenal. Ele mostrou melhorar as chances de sobrevivência desses pacientes e aumentar a duração do tempo antes da remissão, especialmente quando combinado com outras terapias como radiação ou quimioterapia adicional. O bortezomib inibe a degradação de proteínas envolvidas na morte celular programada (apoptose) das células cancerosas, aumentando assim o sinal de autodestruição nas células do mieloma. Inibidores do proteassoma de segunda geração, dirigidos a diferentes partes do complexo, estão atualmente em testes clínicos.

Resumo

- A síntese proteica é o ponto alto da transferência da informação genética do DNA para as proteínas. Nessa transferência, a informação deve ser traduzida da linguagem de quatro nucleotídios do DNA e do RNA para a linguagem de 20 aminoácidos das proteínas.
- O código genético, no qual três nucleotídios no mRNA (códon) especificam um aminoácido, representa o dicionário de tradução entre essas duas linguagens.
- A molécula de tRNA é a ponte entre a sequência dos nucleotídios no mRNA e os aminoácidos na proteína. O tRNA executa essa tarefa em virtude de sua alça de anticódon, que interage com códons específicos no mRNA, bem como com os aminoácidos, por meio de seu sítio de fixação de aminoácidos localizado na extremidade 3' da molécula.
- O processo de tradução consiste em três partes: iniciação, alongamento e terminação.
- A iniciação envolve a montagem do ribossomo com o tRNA carregado no códon de iniciação (AUG) do mRNA. Esse processo de montagem é mediado por fatores de iniciação e requer o gasto de energia na forma de GTP.
- O alongamento é uma adição ponto a ponto dos aminoácidos individuais à cadeia peptídica em crescimento pela ação da ribozima, peptidil transferase. As moléculas de tRNA carregadas são levadas ao ribossomo por fatores de alongamento à custa da hidrólise de GTP.
- A terminação da síntese proteica ocorre quando o ribossomo chega a um códon de término e fatores de liberação catalisam a liberação da proteína.
- Após a liberação, a proteína recém-sintetizada deve ser enovelada corretamente com a ajuda de proteínas auxiliares chamadas chaperonas e direcionada para compartimentos subcelulares específicos por sequências sinalizadoras.
- Várias proteínas recém-sintetizadas também devem ser modificadas, por uma série de mudanças químicas e estruturais, antes que sejam biologicamente ativas.

Questões para aprendizagem

1. Reveja o mecanismo de ação de vários fármacos que inibem a síntese proteica no ribossomo bacteriano.
2. Liste os mecanismos que asseguram a fidelidade do DNA e da síntese proteica.
3. Descreva as sequências sinalizadoras que direcionam as proteínas para o lisossomo, a mitocôndria ou o núcleo.
4. Discuta o papel do aminoácido *N*-terminal como um fator regulatório da taxa de reciclagem de uma proteína citoplasmática.
5. Explique como os vírus controlam a maquinaria de tradução de proteínas da célula durante uma infecção viral para favorecer a síntese de proteínas virais.

Leituras sugeridas

Back, S. H., Kaufman, R. J. Endoplasmic stress and type 2 diabetes. *Annu Rev Biochem*. 2012; 81:767–793.

Garcia-Robles, I., Sanchez-Navarro, J., de la Pena, M. Intronic hammerhead ribozymes in mRNA biogenesis. *Biol Chem*. 2012; 393:1317–1326.

Grudnik, P., Bange, G., Sinning, I. Protein targeting by the signal recognition particle. *Biol. Chem*. 2009; 390:775–782.

Korostelev, A., Noller, H. F. The ribosome in focus: new structures bring new insights. *Trends Biochem Sci*. 2007; 32:434–441.

Rodnina, M. V., Beringer, M., Wintermeyer, W. How ribosomes make peptide bonds. *Trends Biochem Sci*. 2007; 32:20–26.

Schmeing, T. M., Ramakrishnan, V. What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation. *Nature*. 2009; 461:1234–1242.

Walter, P., Ron, D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*. 2011; 334:1081–1086.

Wang, S., Kaufman, R. J. The impact of the unfolded protein response on human disease. *J Cell Biol*. 2012; 197:857–867.

Sites

Genetic code: www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Utils/wprintgc.cgi?mode=c

IRES: www.iresite.org

Proteasome: http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/P/Proteasome.html

Ubiquitin: www.rcsb.org/pdb/101/motm.do?momID=60

Ribosome: www.mrc-lmb.cam.ac.uk/ribo/homepage/mov_and_overview.html

www.weizmann.ac.il/sb/faculty_pages/Yonath/home.html

CAPÍTULO 35

Regulação da Expressão Gênica: Mecanismos Básicos

Jeffrey R. Patton, D. Margaret Hunt and Andrew Jamieson

Objetivos

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever os mecanismos gerais de regulação da expressão gênica, com ênfase no início da transcrição.
- Descrever os muitos níveis pelos quais a expressão gênica pode ser controlada, usando a expressão gênica induzida por esteroide como modelo.
- Explicar como o *splicing* alternativo de mRNA, os promotores substitutos para o início da síntese de mRNA, a edição pós-transcricional do mRNA e a inibição da síntese de proteína por RNAs pequenos podem modular a expressão de um gene.
- Explicar como a estrutura e o empacotamento da cromatina podem afetar a expressão gênica.
- Explicar como o *imprinting* genômico afeta a expressão gênica, dependendo de se os alelos são de herança materna ou paterna.

Introdução

Embora o DNA seja idêntico em todas as células, a expressão gênica varia significativamente com o sexo, o tempo e o local no organismo

O estudo dos genes e o mecanismo pelo qual a informação que eles armazenam é convertida em proteínas e enzimas, hormônios e moléculas de sinalização intracelular é o domínio da biologia molecular. Excetuando-se o eritrócito, todas as células no organismo têm o mesmo complemento de DNA. Um dos aspectos mais fascinantes deste trabalho é o estudo dos mecanismos que controlam a expressão gênica diferencial, tanto no tempo como no espaço, e as consequências caso estes mecanismos sejam perdidos.

O objetivo deste capítulo é introduzir os conceitos básicos envolvidos na regulação de genes que codificam proteínas e como esses processos estão comprometidos com as causas das doenças humanas. Primeiro, o mecanismo básico da regulação gênica será descrito, seguido da discussão de um sistema de regulação gênica específico para destacar vários aspectos do mecanismo básico. O capítulo terminará com uma discussão das diversas maneiras pelas quais o aparato regulador gênico pode ser adaptado para se ajustar às necessidades dos diferentes tecidos e situações.

Mecanismos básicos da expressão gênica

A expressão gênica é regulada em vários níveis diferentes

O controle da expressão gênica em seres humanos ocorre principalmente ao nível de transcrição, a síntese de mRNA. No entanto, a transcrição é apenas a primeira etapa da conversão da informação genética codificada por um gene no produto gênico final processado, e tem se tornado cada vez mais evidente que eventos pós-transcricionais permitem o controle excelente da expressão gênica. A sequência de eventos envolvidos na expressão final de um gene específico pode ser resumida como:

Início da transcrição
→ processamento do transcrito
→ transporte para o citoplasma
→ tradução do transcrito em proteína
→ processamento pós-transcricional da proteína

Em cada uma dessas etapas, as condições permitem que a célula prossiga para o próximo passo, atenue ou pare o processo. Por exemplo, se o processamento do RNA não está correto ou completo, o mRNA resultante seria inútil ou possivelmente destruído. Além disso, se o mRNA não for transportado para fora do núcleo, ele não será traduzido. Evidentemente, durante o crescimento de um embrião humano de um único ovo fertilizado até um bebê recém-nascido, devem ocorrer inúmeras mudanças na regulação dos genes para permitir a diferenciação de uma única célula em muitos tipos celulares que desenvolvem características específicas do tecido. De modo similar, na puberdade existem mudanças na secreção de hormônios pituitários que resultam na secreção cíclica de hormônios ovarianos e adrenais nas mulheres e a produção de características sexuais secundárias. Esses eventos programados são comuns a todos os organismos celulares, e a produção dessas mudanças fenotípicas nas células – e, portanto, no organismo como um todo – surge como resultado de alterações na expressão de genes-chave. A expressão dos genes essenciais para esses processos varia dependendo do tipo celular e do estágio do desenvolvimento, mas os mecanismos que fundamentam as mudanças estão disponíveis a basicamente todas as células. Em seres humanos e na maioria dos outros eucariotos, são inúmeros os mecanismos que regulam a expressão gênica; algumas das exigências e opções disponíveis a cada um dos estágios estão esquematizadas na Tabela 35.1.

Tabela 35.1

Exigências e opções para o controle da expressão gênica

Processo	Exigências	Opções
Transcrição do mRNA	A cromatina é relaxada (a cromatina condensada é um molde ruim)	Transcrição alelo-específica
	DNA no estado hipometilado (metilação do promotor inibe a transcrição)	Seleção de promotores alternativos, resultando em diferentes sítios de início
	Fatores de ação *trans* corretos estão presentes (como fatores e cofatores de transcrição)	
Processamento do mRNA	Adição do cap no terminal 5′ do mRNA	
	A cauda poli A é adicionada ao terminal 3′ da maioria das mensagens	Muitos transcritos sofrem *splicing* alternativo, aumentando o potencial de codificação
	Para a maioria dos mRNAs, o transcrito sofre *splicing*	Os mRNAs podem ser editados para alterar a sequência codificadora, mudando aminoácidos ou criando um códon de parada
		Sinais nas regiões 3′ não traduzidas (UTR) dos mRNAs podem estabilizar ou marcar o RNA para destruição
Tradução do mRNA	O mRNA deve ser transportado para o citoplasma	O mRNA pode estar localizado em regiões específicas do citoplasma, como os terminais dos axônios, para tradução local
	Todos os fatores necessários para a síntese de proteína	Códons de iniciação alternativos devido ao sítio interno de entrada no ribossomo (IRES)
		Tradução em ribossomos livres ou no retículo endoplasmático rugoso
		Os miRNAs podem inibir a tradução
Renovação (*turnover*) de proteínas	Proteína de meia-vida única	As proteínas estruturais tendem a efetuar lentamente o *turnover* de colágenos
		As proteínas do ciclo celular sofrem *turnover* rápido para limitar a mitose
		Algumas proteínas contêm sequências que as direcionam para a degradação rápida

A transcrição gênica depende de elementos-chave na região do gene

A etapa essencial na transcrição de um gene que codifica proteína é a conversão da informação armazenada no DNA do gene em RNA mensageiro, que pode, então, ser usado como molde para a síntese do produto proteico do gene. Para a expressão de um gene ocorrer, a enzima que catalisa a formação de mRNA, a RNA polimerase II (RNApol II), deve ser capaz de reconhecer o chamado ponto de início de transcrição do gene. A RNAPol II usa uma fita do DNA molde para criar um ponto de início de RNA novo, complementar (frequentemente chamado **transcrito primário ou pré-mRNA**), que é então modificado de várias maneiras, comumente incluindo a adição de um **cap 7-metilguanosina (m^7GPPP)** no terminal 5′, a cauda poli A no terminal 3′, e a remoção de

íntrons para formar um mRNA maduro (Cap. 33). No entanto, a RNAPol II não pode iniciar a transcrição sozinha; ela requer outros fatores para auxiliar no reconhecimento de sequências gênicas críticas e outras proteínas ligadas nas vizinhanças do ponto de início de transcrição.

Promotores

Os promotores encontram-se geralmente *upstream* do sítio de início da transcrição de um gene

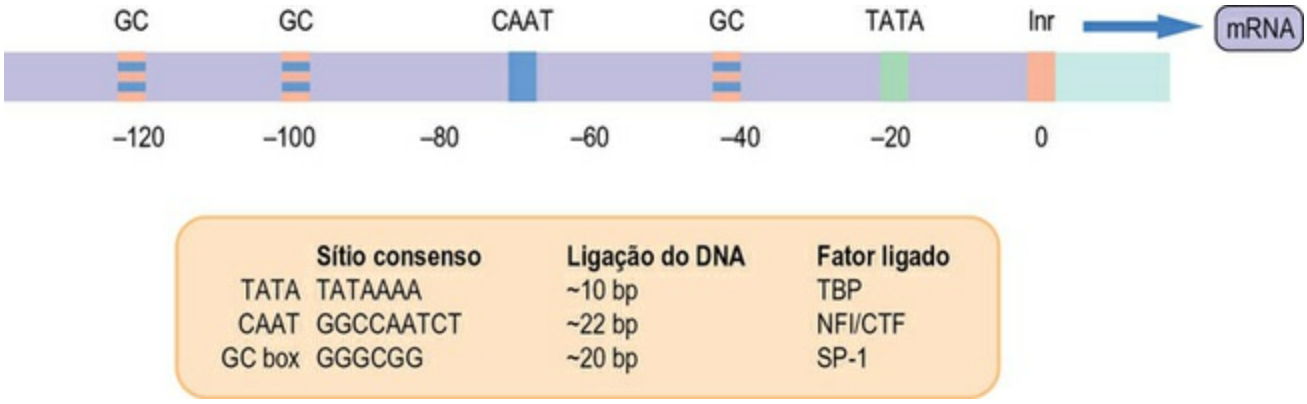
As sequências que estão relativamente próximas ao início da transcrição de um gene e controlam sua expressão são coletivamente chamadas de promotoras. Como geralmente estão distantes algumas centenas ou alguns milhares de nucleotídios do ponto de início, são normalmente denominadas promotoras proximais. A sequência promotora atua como uma unidade de reconhecimento básica, sinalizando que existe um gene que pode ser transcrito e fornecendo a informação necessária para a RNAPol II reconhecer o gene e iniciar corretamente a síntese de RNA, tanto no local correto quanto usando a fita correta do DNA como molde. O promotor também desempenha um papel importante ao determinar que o RNA seja sintetizado no momento exato na célula certa. A maioria das regiões de controle do promotor está em posição anterior (*upstream*) (5′) ao ponto de início de transcrição, portanto não é transcrita em RNA. Ocasionalmente, alguns elementos do promotor podem estar em posição posterior (*downstream*) ao ponto de início da síntese de RNA e de fato ser transcritos em RNA. A estrutura dos promotores varia de gene para gene, mas existem vários elementos de sequência-chave que podem ser identificados dentro do promotor. Esses elementos podem estar presentes em combinações diferentes, alguns elementos estando presentes em um gene e ausentes em outro. Sequências mais distantes do local de início da transcrição, algumas das quais são conhecidas como **acentuadores** (*enhancers*), podem também ter um impacto importante na transcrição de um gene. Frequentemente se diz que estes elementos fazem parte do promotor distal do gene.

A eficiência e a especificidade da expressão gênica são conferidas por elementos de ação cis

Um promotor exerce seu efeito porque ele está no mesmo segmento de DNA que o gene que está sendo transcrito, sendo designado como uma **sequência de ação *cis*** ou um elemento para enfatizar que ele afeta somente o gene próximo no mesmo cromossomo. Uma vez que o promotor é crítico para a expressão gênica, é frequentemente reconhecido como sendo parte do gene que ele controla, visto que sem ele o mRNA não seria sintetizado.

A sequência de nucleotídio imediatamente ao redor do início da transcrição de um gene varia de gene para gene, entretanto o primeiro nucleotídio transcrito de mRNA tende a ser adenosina, geralmente seguido por uma sequência rica em pirimidina, denominada **iniciador (Inr)**. Em geral, ele tem a sequência de nucleotídios Py_2CAPy_5 (Py-

base pirimidínica) e é encontrado entre as posições –3 e +5 em relação ao ponto de início. Além do Inr, a maioria dos promotores possui uma sequência conhecida como **TATA box**, localizada aproximadamente 25 pb acima (*upstream*) do início da transcrição. O TATA box tem uma sequência consenso de 8 pb que geralmente consiste inteiramente em pares de bases adenina-timina (A-T), embora muito raramente um par guanina-citosina (G-C) possa estar presente. Essa sequência parece ser muito importante no processo de transcrição, já que substituições de nucleotídios que interrompem o TATA box resultam em uma redução marcante da eficiência da transcrição. As posições do Inr e do TATA box em relação ao início são relativamente fixas (Fig. 35.1). Dito isso, deve-se destacar que muitos genes eucarióticos não têm um TATA box identificável e que outras sequências são essenciais para delinear o início da transcrição.



	Sítio consenso	Ligação do DNA	Fator ligado
TATA	TATAAAA	~10 bp	TBP
CAAT	GGCCAATCT	~22 bp	NFI/CTF
GC box	GGGCGG	~20 bp	SP-1

FIG. 35.1 Versão idealizada de um promotor incluindo vários elementos. Cada elemento do promotor tem uma sequência consenso-específica que se liga a fatores ubíquos que ativam a transcrição. A ligação de fatores de transcrição envolve o sítio consenso e um número variável de nucleotídios adjacentes anônimos, dependendo do elemento promotor. CTF, um membro de uma família de proteína cujos membros atuam como fatores de transcrição; TBP, proteína de ligação ao TATA; NFI, fator nuclear I; SP-1, fator de transcrição ubíquo.

Além do TATA box, outros elementos promotores de ação *cis* comumente encontrados têm sido descritos. Por exemplo, o **CAAT box** é frequentemente encontrado em posição anterior (*upstream*) ao TATA box, tipicamente distante cerca de 80 pb do início da transcrição. Como no caso do TATA box, ele pode ser mais importante por sua capacidade de aumentar a força do sinal promotor do que de controlar a expressão tecido ou tempo-específica do gene. Outro elemento promotor comumente observado é o GC **box**, uma sequência rica em GC; cópias múltiplas podem ser encontradas em uma única região promotora.

Na Figura 35.1 estão listados alguns dos elementos comuns de ação *cis* vistos dentro dos promotores. Estes elementos promotores se ligam a fatores proteicos (fatores de transcrição) que reconhecem a sequência de DNA de cada elemento em particular. Alguns fatores de transcrição estimulam a transcrição, outros a suprimem; alguns são expressos ubiquamente, outros são expressos em um padrão tecido ou tempo-específico, portanto a disposição dos fatores ligados a uma região promotora pode variar de célula para célula, tecido para tecido, e ser afetada pelo estado do organismo. Esses fatores, ligados a sequências promotoras, determinam quão ativamente a RNAPol II copia o DNA

em RNA.

Quadro de conceitos avançados

Identificando a função e a especificidade de sequências de nucleotídios

As **sequências consenso** são sequências nucleotídicas que contêm elementos centrais únicos que identificam a função e a especificidade da sequência, como, por exemplo, o TATA box. A sequência do elemento pode diferir por alguns poucos nucleotídios em diferentes genes, mas uma sequência central, ou consenso, está sempre presente. Em geral, as diferenças não influenciam a eficiência da sequência. Essas sequências consenso são reconhecidas por comparação dos promotores dos mesmos genes de diferentes espécies de eucariotos, por comparação de sequências dos promotores de genes que se ligam ao mesmo fator de transcrição, ou determinando-se a sequência real de DNA que serve como elemento de ligação para o fator (Fig. 35.1).

Promotores alternativos

Os promotores alternativos permitem a expressão gênica específica a um tecido ou a um estágio de desenvolvimento

Embora esteja claro que um promotor seja essencial para a expressão gênica ocorrer, um único promotor pode não possuir a especificidade tecidual ou a especificidade do estágio de desenvolvimento necessária para permitir que ele direcione a expressão de um gene sempre no tempo e no local corretos. Alguns genes desenvolveram uma série de promotores que conferem expressão tecido-específica. Além do uso de diferentes promotores que estão fisicamente separados, cada um dos promotores alternativos frequentemente está associado ao seu primeiro éxon e, como resultado, cada mRNA e a proteína subsequente têm um terminal 5′ e uma sequência de aminoácidos tecido-específicos. Um bom exemplo do uso de promotores alternativos em seres humanos é o gene para a distrofina, a proteína do músculo deficiente na distrofia muscular de Duchenne (Cap. 20). Esse gene usa promotores alternativos que originam proteínas específicas do cérebro, músculo e retina, todas com sequências de aminoácidos *N*-terminal diferentes.

Acentuadores

Os acentuadores *(enhancers)* modulam a intensidade da expressão gênica em uma célula

Embora o promotor seja essencial para o início da transcrição, não necessariamente influencia sozinho a força da transcrição de um gene específico. Outro grupo de elementos conhecidos como acentuadores pode regular o nível da transcrição de um gene, mas diferentemente dos promotores, suas posições podem variar enormemente em

relação ao ponto de início da transcrição, e sua orientação não tem efeito na sua eficiência. Os acentuadores podem estar acima (*upstream*) ou abaixo (*downstream*) de um promotor e podem ser importantes em conferir transcrição tecido-específica. Por exemplo, um promotor não específico pode iniciar a transcrição somente em presença de um acentuador tecido-específico. Alternativamente, um promotor tecido-específico pode iniciar a transcrição, mas com uma eficiência bastante aumentada na presença de um acentuador próximo que não é tecido-específico. Em alguns genes, como, por exemplo, os da imunoglobulina, os acentuadores podem de fato estar presentes abaixo (*downstream*) do ponto de início da transcrição, dentro de um íntron do gene que esteja sendo ativamente transcrito.

Elementos de resposta

Os elementos de resposta são sítios de ligação para fatores de transcrição e regulam coordenadamente a expressão de múltiplos genes, como, por exemplo, na resposta a estímulos hormonais ou ambientais

Elementos de resposta são sequências de nucleotídios que permitem estímulos específicos, como hormônios esteroidais (elemento de resposta a esteroide [SRE]), monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) (elemento de resposta ao AMP cíclico [CRE]) ou fator de crescimento 1 semelhante à insulina (IGF-1) (elemento de resposta à insulina [IRE]), para estimular ou reprimir a expressão gênica. Os elementos de resposta são frequentemente parte dos promotores ou acentuadores, onde eles funcionam como sítios de ligação de fatores de transcrição específicos. Os elementos de resposta nos promotores são sequências de ação *cis* com um comprimento tipicamente de 6-12 bases. Um único gene pode possuir vários elementos de resposta diferentes, possivelmente tendo a transcrição provocada por um estímulo e inibida por outro. Múltiplos genes podem possuir o mesmo elemento de resposta, o que facilita a coindução ou a correpressão de grupos de genes, como em resposta a um estímulo hormonal.

Fatores de transcrição

Os fatores de transcrição são proteínas de ligação ao DNA que regulam a expressão gênica

Promotores, acentuadores e elementos de resposta são partes do gene: fatores de transcrição são as proteínas que reconhecem estas estruturas. Essas proteínas de ligação a sequências específicas do DNA se ligam a sequências específicas de nucleotídios e produzem expressão diferencial do gene durante o desenvolvimento e também nos tecidos do organismo maduro (Fig. 35.2). Muitos fatores de transcrição atuam positivamente e promovem a transcrição, enquanto outros atuam negativamente e promovem o silenciamento do gene. O padrão único dos fatores de transcrição presentes na célula determinará, em grande parte, qual porção do genoma será transcrita em RNA em qualquer célula. Os fatores de transcrição são algumas vezes denominados **fatores de**

ação *trans* para enfatizar que, como proteínas solúveis, eles podem se difundir dentro do núcleo e atuar em múltiplos genes diferentes em cromossomos distintos.

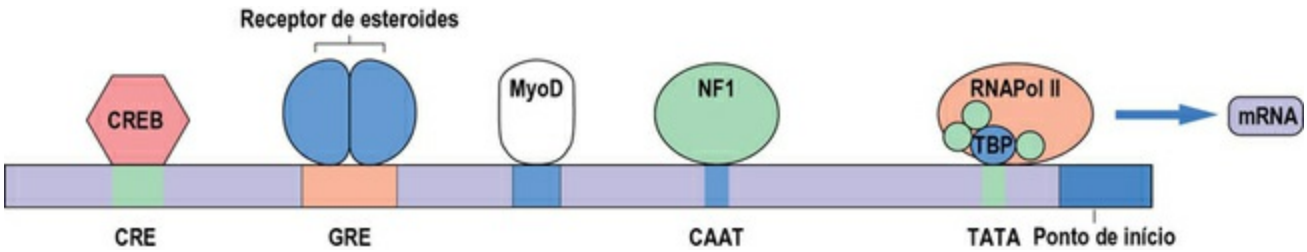


FIG. 35.2 Regulação da expressão gênica por elementos reguladores específicos. A ligação de fatores de transcrição a um elemento de resposta a esteroides modula a taxa de transcrição da mensagem. Diferentes elementos têm efeitos variáveis no nível de transcrição, alguns exercendo efeitos maiores do que outros, e podem também ativar a expressão tecido-específica. CRE, elemento de resposta ao AMP cíclico; CREB, proteína de ligação ao CRE; GRE, elemento de resposta ao glicocorticoide; MyoD, fator de transcrição específico das células musculares; NF1, fator nuclear 1. As proteínas são mostradas em uma disposição linear por conveniência, mas elas interagem fisicamente umas com as outras, tanto por causa do seu tamanho como devido ao empacotamento do DNA.

Existem outros tipos de proteínas envolvidos na regulação da transcrição além dos fatores de transcrição sequência-específicos. Os chamados fatores de transcrição gerais, como TFIIA, B, D, E etc., formam um complexo com RNAPol II e este complexo é necessário para o início da transcrição. Esses **fatores de transcrição gerais** são necessários para o uso bem-sucedido de todo promotor; eles variam de certa forma com a classe do gene, sendo geralmente diferentes para as RNA polimerases I, II e III. Em células eucarióticas e células de mamíferos, em particular, as próprias RNA polimerases não podem reconhecer as sequências promotoras. É função dos fatores gene-específicos criar um ambiente local que possa com sucesso atrair os fatores gerais, que, por sua vez, atrairão a polimerase. No entanto, existe evidência emergente de que o próprio complexo da RNA polimerase pode também ser importante na regulação da expressão gênica.

Quadro de conceitos avançados

O que é um "gene"? unidade de transcrição *versus* gene

Definir exatamente o que é um "gene" tem se tornado muito difícil nos últimos anos. A ideia inicial de que um gene era um segmento do DNA que origina um produto gênico único – um gene, uma proteína – tem sido contestada. Está claro que muitos produtos funcionais – espécies de mRNA diferentes ou diferentes produtos gênicos – podem se originar de uma única região do DNA transcrito como resultado de diferenças ao nível de transcrição ou ao nível pós-transcricional. Portanto existe agora uma tendência de se referir a esses "genes" como unidades de transcrição. A unidade de transcrição engloba não apenas as partes do gene, como promotores, éxons e íntrons, classicamente denominados como unidade gênica, mas também os elementos moleculares que modificam o processo de transcrição do seu início até as modificações

pós-transcricionais finais. Essa é uma mudança da ideia de que um gene é uma fita de DNA com éxons e íntrons, para uma ideia de um gene sendo uma estrutura complexa que direciona um processo dinâmico, originando o produto ou os produtos gênicos finais nos vários estágios do desenvolvimento de um organismo.

Além disso, outras proteínas podem se ligar a fatores de transcrição sequência-específicos e modular sua função ao reprimir ou ativar a expressão gênica; esses fatores são frequentemente chamados **coativadores** ou **correpressores.** Portanto a taxa global da transcrição de RNA de um gene é resultado do efeito recíproco complexo de uma enormidade de fatores de transcrição, coativadores e correpressores. Uma vez que existem milhares desses fatores em uma célula, há um número grande, quase inimaginável, de combinações que podem ocorrer e, portanto, o controle da expressão gênica pode ser muito específico e muito sutil.

Em procariotos, os elementos *cis* que controlam o local de início e, em geral, o início da transcrição, estão posicionados mais próximo ao ponto de início. Esses elementos *cis* são menores em número, havendo muito menos diversidade (Cap. 33) quando em comparação com aqueles dos eucariotos. Além disso, existem menos fatores de ação *trans*, e o controle da expressão gênica é muito menos sutil nos procariotos. No entanto, entender as limitações do controle da expressão gênica em procariotos permite apreciar a flexibilidade das estratégias de controle encontradas em eucariotos.

O início da transcrição requer a ligação de fatores de transcrição ao DNA

Para a transcrição ocorrer, os fatores de transcrição devem se ligar ao DNA. A proteína conhecida como **proteína de ligação ao TATA (TBP)** se liga à região do TATA box. A TBP é um fator de transcrição geral associado ao complexo da RNAPol II e a um número variável de outras proteínas. A ligação da TBP ao TATA box direciona o posicionamento do aparato de transcrição a uma distância fixa do ponto de início da transcrição e, portanto, permite que a RNAPol II seja posicionada exatamente no local de início da transcrição. Uma vez que a RNAPol II e vários outros fatores de transcrição tenham se ligado à região do ponto de início, a transcrição pode ocorrer. Quando a transcrição se inicia, muitos fatores de transcrição necessários para a ligação e o alinhamento da RNAPol II são liberados e a polimerase se desloca ao longo do DNA, formando o transcrito de pré-mRNA.

Os fatores de transcrição têm locais de ligação ao DNA altamente conservados

A ligação dos fatores de transcrição ao DNA envolve uma área relativamente pequena da proteína fator de transcrição, que está em estreito contato com a fenda maior e/ou menor do DNA de dupla hélice a ser transcrito. As regiões dessas proteínas que entram em contato com o DNA são chamadas domínios ou motivos (*motifs*) de ligação ao DNA e são altamente conservadas entre as espécies. Existe uma variedade de domínios de ligação ao DNA, alguns dos quais ocorrem em diversos fatores de transcrição ou em vários momentos no mesmo fator. **Quatro classes comuns de domínios de ligação ao DNA são os motivos de hélice-volta-hélice e hélice-alça-hélice, os dedos de zinco (a seguir) e os**

***zippers* de leucina.** A maioria dos fatores de transcrição sequência-específica contém pelo menos um desses motivos de ligação ao DNA; proteínas com função desconhecida que contêm qualquer um desses motivos provavelmente são fatores de transcrição. O fator de transcrição médio tem 20 ou mais sítios de contato com o DNA, que amplifica a força e a especificidade da interação.

Além de um domínio de ligação ao DNA, os fatores de transcrição sequência-específicos também têm um **domínio regulador de transcrição** que é necessário para sua capacidade de modular a transcrição. Este domínio pode funcionar de várias maneiras. Pode interagir diretamente com o complexo RNA polimerase-fator de transcrição geral, pode ter efeitos indiretos via proteínas coativadoras ou correpressoras, ou pode estar envolvido em remodelar a cromatina (a seguir) e, então, alterar a capacidade do promotor de recrutar outros fatores de transcrição.

Uma maneira de caracterizar a interação de um fator de transcrição com uma sequência de DNA específica é por meio da técnica denominada **ensaio de mudança de mobilidade eletroforética** (**EMSA**) (Fig. 35.3). Esse método tem sido usado para ajudar na purificação de fatores de transcrição, identificá-los em misturas complexas (como um extrato celular), delinear o tamanho do sítio de ligação e estimar a força da interação entre o fator e a sequência de DNA que ele reconhece.

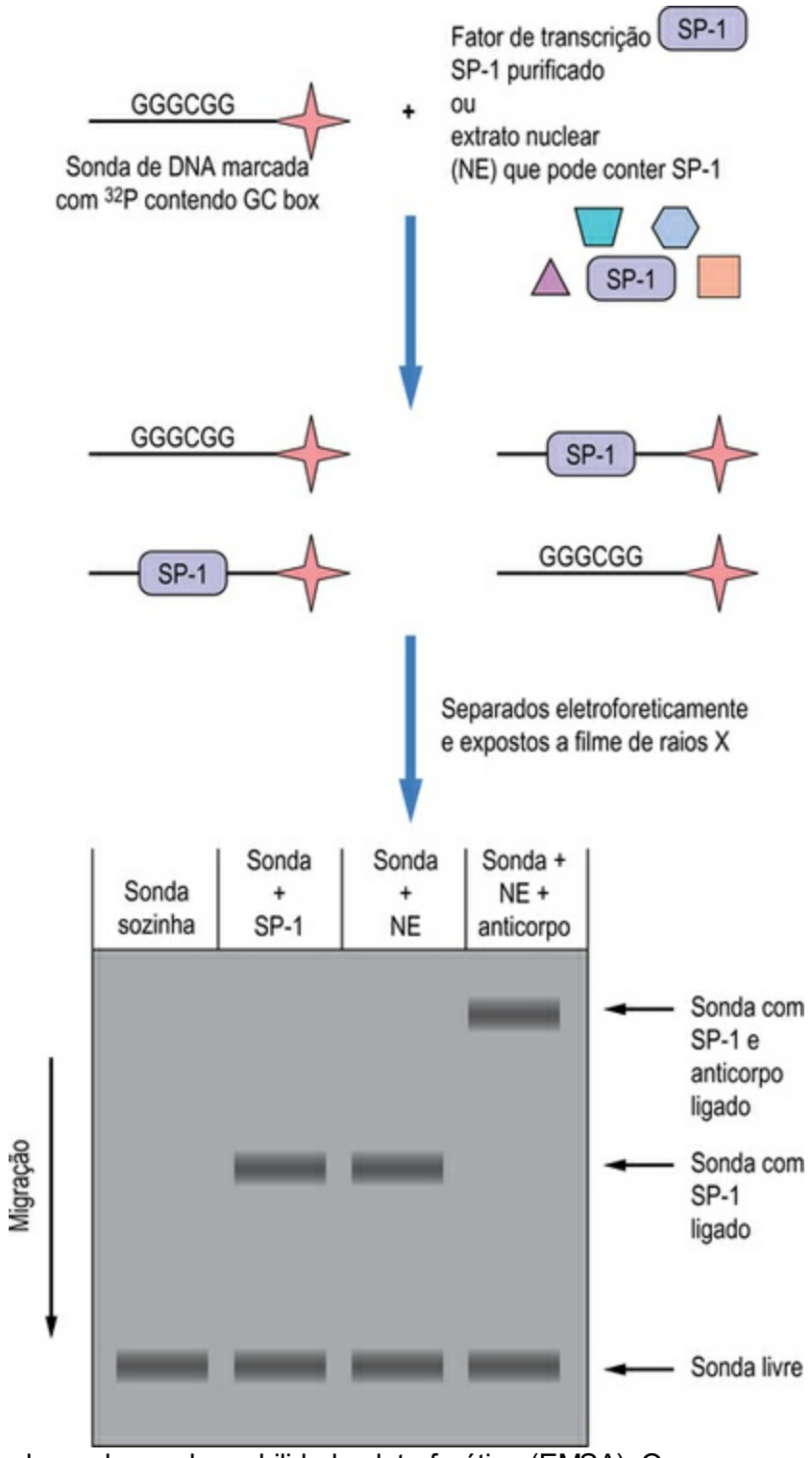


FIG. 35.3 Ensaio de mudança de mobilidade eletroforética (EMSA). Os componentes básicos do método de EMSA estão incluídos no diagrama. Nesse exemplo, uma sonda de DNA marcada com ^{32}P é primeiramente incubada com o fator de transcrição SP-1 purificado ou com o extrato nuclear (NE) que contém SP-1 e, então, submetida à eletroforese em gel nativo (não desnaturante). Se SP-1 se liga à sonda, ele apresenta uma mobilidade menor no gel do que a sonda sem a proteína ligada (sonda livre). Se um anticorpo para SP-1 é incluído na reação com NE, então o complexo anticorpo sonda/anti-SP-1 migra ainda mais lentamente, confirmando que a proteína ligada à sonda é de fato SP-1. EMSA pode ser usado para ajudar a caracterizar qualquer interação ácido nucleico-proteína, incluindo a interação de RNAs e proteínas.

Receptores de esteroides

Os receptores esteroides possuem muitas características de fatores de transcrição e fornecem um modelo para a função das proteínas de dedo de zinco na ligação ao DNA

Os hormônios esteroides têm uma grande gama de funções em seres humanos e são essenciais à vida normal. Eles são derivados de um precursor comum, o colesterol, e compartilham, portanto, uma parte estrutural similar (Cap. 17). Entretanto, diferenças na hidroxilação de certos átomos de carbono e na aromatização do anel A do esteroide originam diferenças marcantes no efeito biológico. Os esteroides produzem seus efeitos biológicos por se ligarem a receptores de hormônios esteroide-específicos, os quais são encontrados no citoplasma e no núcleo da célula. Para os receptores do tipo I (citoplasmático), o ligante esteroide induz mudanças estruturais que levam à dimerização do receptor e à exposição de um **sinal de localização nuclear (NLS)**; esse sinal, tanto quanto a dimerização, é comumente bloqueado por uma proteína *heat shock*, que é liberada com a ligação do esteroide. O complexo ligante-receptor agora entra no núcleo, onde se liga ao DNA em um elemento de resposta específico, o SRE, também chamado **elemento de resposta ao hormônio (HRE)**. Os SREs podem ser encontrados muitas quilobases acima (*upstream*) ou abaixo (*downstream*) do início da transcrição. O complexo esteroide-receptor funciona como um fator de transcrição sequência-específico, e a ligação do complexo ao SRE resulta na ativação do promotor e no início da transcrição (Fig. 35.4) ou, em alguns casos, na repressão da transcrição. Como seria de se esperar, por causa do grande número de esteroides encontrados em seres humanos, existe um número correspondentemente grande de proteínas receptoras de esteroides distintas, e cada uma dessas reconhece uma sequência consenso, um SRE, na região de um promotor.

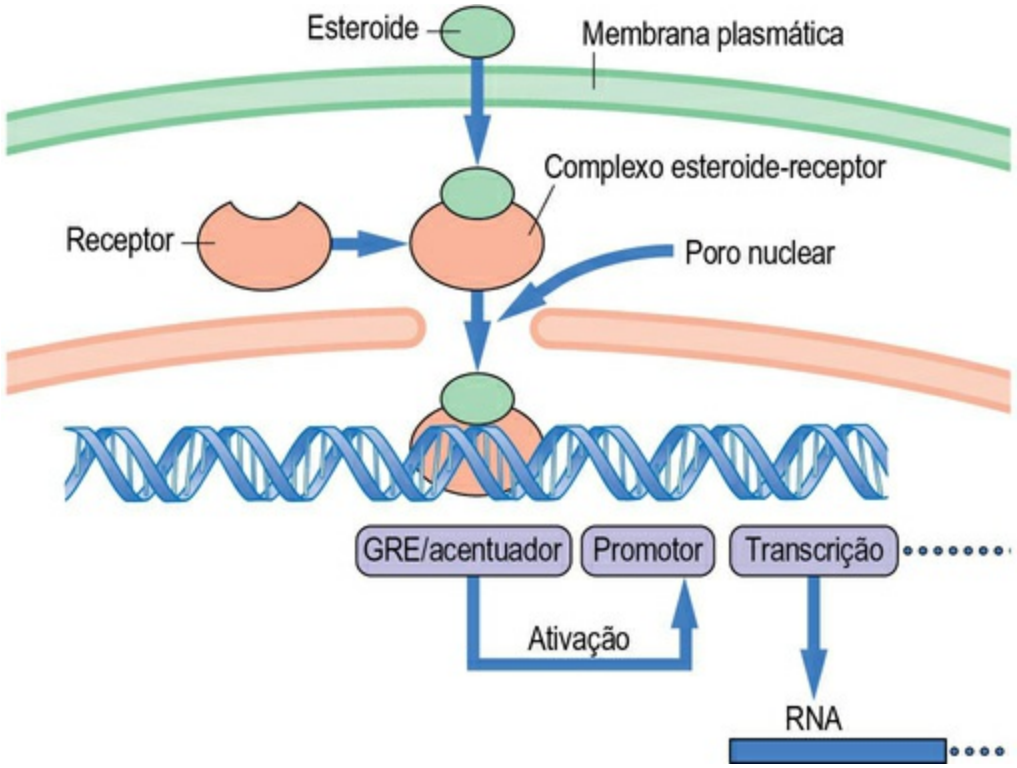


FIG. 35.4 Regulação da transcrição gênica por glicocorticoides. Os esteroides induzem a dimerização das moléculas do receptor que, por sua vez, se ligam a um acentuador, ativando a transcrição do gene. GRE, elemento responsivo a glicocorticoides.

O motivo dedo de zinco (*zinc finger*)

Um motivo dedo de zinco nos receptores de esteroides se liga ao elemento de resposta a esteroides no DNA

Essencial ao reconhecimento do SRE no DNA e à ligação do receptor a ele é a presença da comumente chamada região de dedo de zinco no domínio de ligação ao DNA da molécula do receptor. Os dedos de zinco consistem em uma alça de peptídio com um átomo de zinco no seu centro. No dedo de zinco típico, a alça compreende dois resíduos de cisteína e dois de histidina em posições altamente conservadas uma em relação à outra, separadas por um número fixo de aminoácidos intermediários; os resíduos de Cys e His são coordenados ao íon zinco. O dedo de zinco medeia a interação entre a molécula do receptor de esteroide e o SRE na fenda maior do DNA de dupla hélice, aumentando, portanto, a eficiência do promotor e conferindo-lhe especificidade. Os motivos dedo de zinco são geralmente organizados como uma série de dedos repetidos *in tandem;* o número de repetições varia nos diferentes fatores de transcrição. A estrutura exata do dedo de zinco do receptor de esteroide difere da sequência consenso; os dois são comparados na Figura 35.5.

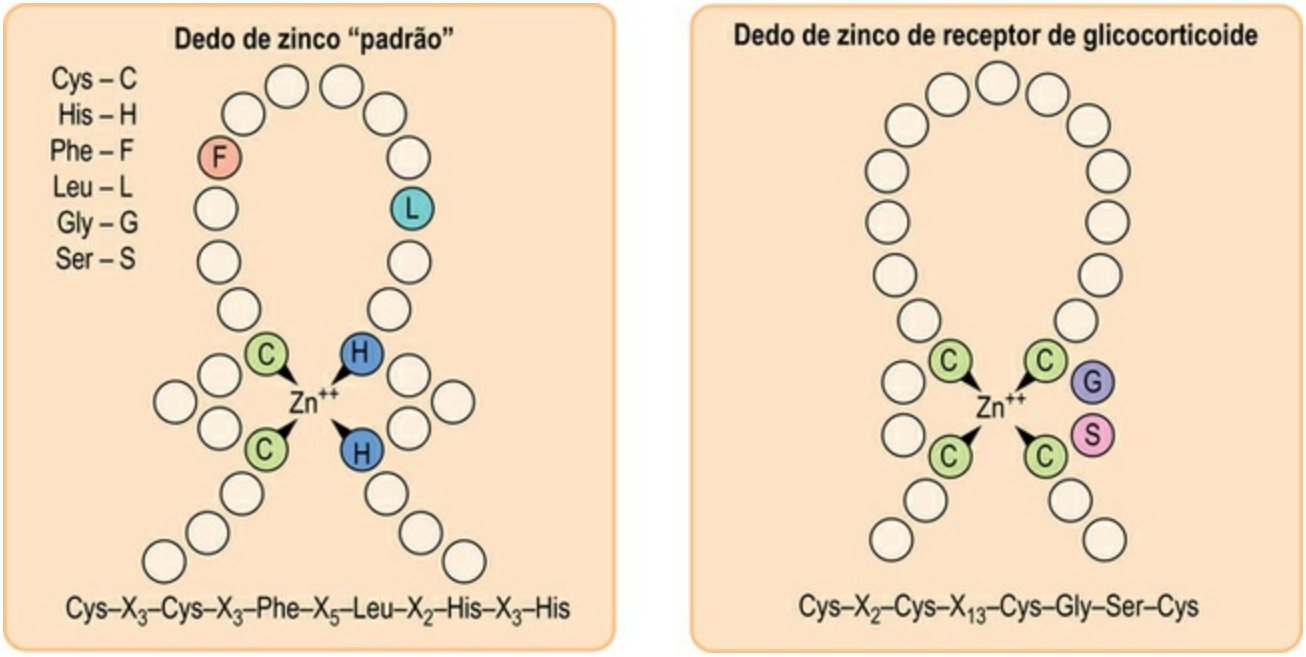


FIG. 35.5 Um dedo de zinco "padrão" e um dedo de zinco de receptor de esteroides. Os dedos de zinco são sequências que ocorrem comumente e que permitem a ligação de proteína ao DNA dupla fita. C, cisteína; G, glicina; S, serina; X, qualquer aminoácido intermediário.

As proteínas de dedo de zinco reconhecem e se ligam a pequenas **sequências palindrômicas** de DNA. Palíndromes são sequências de DNA lidas da mesma maneira (5′ a 3′) nas fitas antiparalelas; por exemplo, 5′-GGATCC-3′ é lida da mesma maneira que a sequência 5′ a 3′ na fita complementar. A dimerização do receptor e o reconhecimento de sequências idênticas nas fitas opostas fortalecem a interação entre o receptor e o DNA e, portanto, aumentam a especificidade do reconhecimento do SRE.

Organização do receptor de esteroide

Os receptores de esteroides são produtos de uma família de genes altamente conservada

Uma característica central de todas as proteínas receptoras de esteroides é a similaridade na organização de suas moléculas de receptor. Cada receptor tem um domínio de ligação ao DNA, um domínio de ativação da transcrição, um domínio de ligação ao hormônio esteroide e um domínio de dimerização. Existem três características marcantes relativas à estrutura dos receptores de hormônios esteroides.

- A região de ligação ao DNA sempre contém uma região dedo de zinco altamente conservada que, se mutada, resulta em perda de função do receptor.
- As regiões de ligação ao DNA de todos os receptores de hormônios esteroides têm um alto grau de homologia umas com relação às outras.
- As regiões de ligação ao esteroide apresentam um alto grau de homologia umas com relação às outras.

Essas características comuns têm identificado as proteínas receptoras de esteroide como produtos de uma família de genes. Parece que, durante o curso da evolução, a diversificação dos organismos resultou na necessidade de diferentes esteroides com

ações biológicas variadas e, consequentemente, um gene ancestral único sofreu duplicação e alteração evolutiva ao longo dos milhões de anos, resultando em um grupo de receptores relacionados, mas ligeiramente diferentes (Fig. 35.6).

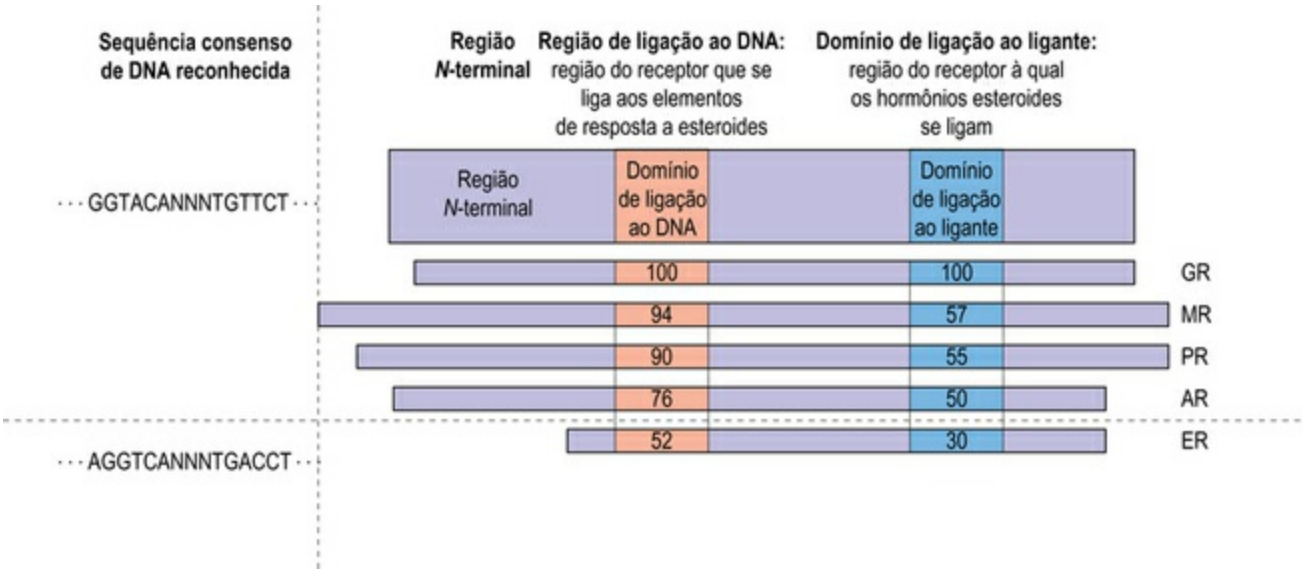


FIG. 35.6 Similaridades entre diferentes receptores de esteroides. As regiões de ligação ao DNA e de ligação ao hormônio dos receptores de esteroide compartilham um alto grau de homologia. O receptor de estrogênio é menos similar ao receptor de glicocorticoide do que os outros. AR, receptor de androgênio; ER, receptor de estrogênio; GR, receptor de glicocorticoide; MR, receptor de mineralocorticoide; PR, receptor de progesterona; NNN, quaisquer três nucleotídios. Os números denotam a porcentagem de homologia de aminoácidos na sequência do GR.

Quadro de conceitos avançados

Família de genes dos receptores de esteroides: receptores do hormônio da tireoide

A família dos genes dos receptores de esteroides, embora grande, é de fato somente um subgrupo de uma família muito maior dos comumente conhecidos receptores nucleares. Todos os membros dessa família têm a mesma estrutura básica que os receptores de hormônios esteroides: uma região *N*-terminal hipervariável, uma região de ligação ao DNA altamente conservada, uma região em dobradiça (*hinge*) variável e um domínio de ligação ao ligante altamente conservado (Fig. 35.6). Eles estão separados em dois grupos básicos. Os **receptores tipo I (citoplasmáticos)** são um grupo de proteínas receptoras que formam homodímeros e se ligam especificamente a elementos de resposta a hormônios esteroides na presença de seu ligante, como o receptor de glicocorticoide. Os **receptores tipo II (nucleares)** formam homodímeros que podem se ligar a elementos de resposta na ausência de seu ligante, podendo também formar heterodímeros com outras subunidades de receptor tipo II para formar unidades ativas. Os receptores tipo II incluem os receptores de hormônio da tireoide, a vitamina D e os receptores do ácido retinoico.

Estratégias alternativas de regulação gênica em seres humanos

Acesso ao promotor

A estrutura da cromatina afeta o acesso de fatores de transcrição aos genes e, como tal, a expressão gênica

O DNA no núcleo da célula está empacotado nos nucleossomos e estruturas de ordem superior, em associação a histonas e outras proteínas (Cap. 32), portanto os promotores de alguns genes podem não estar prontamente acessíveis aos fatores de transcrição, mesmo que estes estejam presentes no núcleo. Tem se tornado evidente que o grau de empacotamento de um promotor e a presença, a ausência ou a localização precisa dos nucleossomos em um promotor podem ter efeitos importantes no grau de acesso dos fatores de transcrição sequência-específicos e do complexo RNAPol II associado aos fatores de transcrição gerais. A cromatina condensada, denominada heterocromatina, onde o DNA está fortemente associado aos nucleossomos, não é geralmente um bom molde para a transcrição, sendo, regra geral, necessário que a remodelação da cromatina (ver adiante) ocorra antes que a transcrição prossiga. A eucromatina, constituída por DNA que não está tão fortemente associado aos nucleossomos, contém tipicamente regiões de transcrição gênica ativa. A remodelação pode também ser necessária em porções de eucromatina, dependendo da célula ou do tecido, mas o estado inicial da cromatina é menos condensado. Porções de um cromossomo que são empacotadas em heterocromatina em um tipo de célula podem estar sob a forma de eucromatina em uma célula diferente, permitindo a regulação da expressão gênica ao nível da acessibilidade do DNA. Determinadas porções dos cromossomos, como os centrômeros e os telômeros, são exemplos de regiões do genoma que são empacotadas como heterocromatina em todas as células.

O empacotamento das histonas, a estabilidade do nucleossomo e, portanto, a acessibilidade do DNA são controlados pela acetilação e desacetilação reversível de resíduos de lisina nas regiões aminoterminais das histonas centrais, particularmente histonas H3 e H4. As histonas acetiltransferases (HAT) transferem grupos acetil da acetil-CoA para o grupamento amino das lisinas, neutralizando a carga do resíduo de lisina e enfraquecendo a força das interações histona-DNA, permitindo, assim, o relaxamento do nucleossomo. De modo inverso, as enzimas que removem os grupamentos acetil e promovem a condensação local do cromossomo são conhecidas como histona desacetilases (HDACs).

A acetilação e a desacetilação reversível das histonas são importantes no controle da ativação dos promotores. De fato, alguns fatores de transcrição ou coativadores de transcrição exibem atividade HAT e podem remodelar a cromatina. No caso de alguns promotores, a ligação de um fator de transcrição pode resultar no reposicionamento dos nucleossomos da próxima vez que o DNA se replicar, tornando mais provável a transcrição do gene após a divisão celular. A interação dinâmica da estrutura da

cromatina, do fator de transcrição e da ligação do cofator é importante para determinar se um gene será transcrito e com que eficiência a RNA polimerase o sintetizará.

A metilação do DNA regula a expressão gênica

A metilação é uma de várias modificações epigenéticas do DNA; os padrões de metilação do DNA ao nascimento têm influência no risco de várias doenças relacionadas com a idade

Certos nucleotídios, principalmente a citidina, podem sofrer metilação enzimática sem afetar o pareamento Watson-Crick. Os resíduos de citidina metilados são quase sempre encontrados associados à guanosina, como o dinucleotídio CG, e no DNA dupla fita a citidina complementar também se encontra metilada, originando uma sequência palindrômica:

$$5' \; {}^{m}\mathrm{CpG} \; 3'$$

$$3' \; \mathrm{GpC}^{m} \; 5'$$

A presença da citidina metilada pode ser avaliada por suscetibilidade a enzimas de restrição (Cap. 36) que cortam o DNA em sítios contendo grupos CpG somente se o CpG não estiver metilado, em comparação com outras enzimas de restrição que cortam se o CpG estiver ou não metilado. Além disso, uma técnica de sequenciamento com bissulfito, que conta com a reatividade diferencial da metil citidina, pode ser usada para mapear mais precisamente os sítios de metilação. Muitos genes em seres humanos (cerca de 50%) têm o que chamamos de **ilha de CpG (CPI)** na região de seus promotores. Geralmente estas CPIs têm se mostrado não metiladas, exceto em certos estados patológicos e no câncer. Tem se tornado evidente que a **metilação é geralmente associada a regiões do DNA que estão transcrevendo menos ativamente o RNA.** A desmetilação de um promotor pode ser necessária para o início da transcrição, e a desmetilação de uma sequência codificadora do gene pode também ser necessária para a transcrição eficiente. A regulação do estado de metilação dos promotores pode ser um processo mais dinâmico do que se acreditava anteriormente; por exemplo uma diminuição da metilação de determinados promotores gênicos poderá ocorrer no músculo após o exercício.



Quadro de conceitos avançados

Regulação epigenética da expressão gênica

A metilação é um aspecto do estudo da **epigenética**, um domínio vasto que, em geral, aborda modificações hereditárias do DNA e das proteínas que não alteram a sequência do DNA, mas afetam a expressão gênica. Os mecanismos de controle epigenético contemplam **metilação do DNA e acetilação, metilação ou fosforilação das histonas**. A nutrigenômica aborda o papel dos fatores nutricionais na regulação da expressão gênica. Existe alguma evidência de que a intervenção nutricional precoce durante um curto período possa causar *imprinting* nutricional por mecanismos epigenéticos, que podem "ativar" a maquinaria da expressão gênica para o desenvolvimento de doenças que surgem mais tarde, ao longo da vida. Assim, o risco de doenças relacionadas com a idade, como síndrome metabólica, obesidade, aterosclerose, diabetes, artrite e câncer, pode ser influenciado pela dieta e por fatores do estilo de vida durante a juventude.

O impacto de fatores epigenéticos pode alterar nossa abordagem aos cuidados médicos, enfatizando a importância da medicina preventiva e a intervenção precoce para o controle de doenças relacionadas com a idade, uma vez que o ponto de partida para a suscetibilidade para a doença pode ocorrer muitos anos antes do início dos primeiros sintomas. A hipermetilação dos genes supressores tumorais é comumente observada em cânceres humanos. Os fármacos que inibem as DNA metil transferases estão sendo testados como um meio de expor estes genes reprimidos para o tratamento de leucemias. Os genes que regulam negativamente o crescimento celular são frequentemente reprimidos pela deacetilação de histonas, criando uma forma mais compacta (não passível de transcrição) de cromatina. Os **inibidores das histonas desacetilases (HDAC)** estão também sendo testados como agentes terapêuticos para o tratamento de cânceres de crescimento rápido, como os linfomas.

Splicing alternativo do mRNA

O *splicing* alternativo origina muitas variantes de uma proteína a partir de um único pré-mRNA

No Capítulo 33 foi introduzido o conceito de *splicing* do transcrito inicial ou pré-mRNA. A maioria dos pré-mRNAs pode sofrer *splicing* de formas alternativas, e a porcentagem de *splicing* alternativo de transcritos com múltiplos éxons é de, pelo menos, 50%, mas em algumas estimativas pode ser de até 80%. Esse processo pode conferir diversidade suficiente para explicar a unicidade individual, apesar das similaridades no complemento gênico. Portanto, por meio do *splicing* alternativo, um éxon em particular ou alguns éxons alternativos podem ser retirados em algumas, mas não em todas, ocasiões. Uma vez que a maioria dos genes tem vários éxons (a média é de cerca de sete), alguns pré-mRNAs podem por fim originar muitas versões diferentes do mRNA e, da mesma forma, da proteína final. As proteínas podem diferir por apenas alguns poucos aminoácidos ou podem ter diferenças importantes, e essas frequentemente têm funções biológicas distintas. Por exemplo, se um éxon é ou não deletado pode afetar a localização da proteína na célula, se uma proteína permanece na célula ou é secretada, se existem

isoformas específicas no músculo esquelético *versus* cardíaco. O *splicing* alternativo pode também produzir uma proteína truncada, conhecida como **proteína mutante dominante negativa**, que pode inibir a função da proteína íntegra. O *splicing* alternativo é regulado de maneira que certas formas resultantes do *splicing* só podem ser vistas em determinadas células ou tecidos, em certos estágios de desenvolvimento ou sob certas condições. No cérebro humano, existe uma família de proteínas de adesão de superfície celular, as **neurexinas**, que medeiam a complexa rede de interações entre aproximadamente 10^{12} neurônios. As neurexinas estão entre os maiores genes humanos, e centenas, talvez milhares, de isoformas de neurexinas são geradas a partir de somente três genes por promotores e *splicing* alternativos, fornecendo uma gama variada de comunicações intercelulares necessárias para o desenvolvimento das sofisticadas redes neurais. As neurexinas provavelmente têm um conjunto igualmente complexo de isoformas de ligantes, fornecendo uma tremenda flexibilidade de interações celulares reversíveis durante o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC).



Quadro clínico

Splicing alternativo e expressão tecido-específica de um gene: uma menina com um edema no pescoço

Uma menina de 17 anos notou um edema do lado esquerdo de seu pescoço. Fora isso, estava bem, mas tanto sua mãe quanto seu tio materno se submeteram à remoção de tumores adrenais. Seu sangue foi coletado e enviado ao laboratório para medida de calcitonina, que estava fortemente aumentada. A patologia da massa de tireoide excisada confirmou o diagnóstico de carcinoma medular da tireoide. Essa família tem uma mutação genética causando a condição conhecida como neoplasia endócrina múltipla tipo IIA (MEN IIA). A MEN IIA é uma síndrome de câncer autossômica dominante de alta penetrância causada por uma mutação na linhagem germinativa do proto-oncogene RET. Cerca de 5-10% dos cânceres resultam de mutações na linhagem germinativa, mas mutações somáticas adicionais são necessárias para o desenvolvimento do câncer.

Comentário

A expressão do gene da calcitonina fornece um exemplo de como diferentes mecanismos podem regular a expressão gênica e originar produtos gênicos tecido-específicos que têm muitas atividades diferentes. O gene da calcitonina consiste em cinco éxons e usa dois sítios alternativos de sinalização de poliadenilação. Na glândula tireoide, as células C medulares produzem calcitonina usando um sítio de sinalização de poliadenilação associado ao éxon 4 para transcrever um pré-mRNA compreendendo os éxons 1-4. Os íntrons associados são retirados e o mRNA é traduzido para produzir calcitonina; a calcitonina elevada é diagnóstica para esta doença. Entretanto, no tecido neural, um segundo sítio de sinalização de poliadenilação próximo ao éxon 5 é utilizado. Isso resulta em um pré-mRNA compreendendo os cinco éxons e seus íntrons

intermediários. Esse pré-mRNA maior é então processado e, além de todos os íntrons, o éxon 4 é também retirado, deixando um mRNA composto pelos éxons 1-3 e 5, que é, então, traduzido em um potente vasodilatador, o peptídio relacionado com o gene da calcitonina (CGRP).

Edição do RNA ao nível pós-transcricional

O editossomo modifica a sequência nucleotídica interna dos mRNAs maduros

A edição do RNA envolve a alteração do mRNA maduro mediada por enzima antes da tradução. Esse processo, realizado por editossomos (Cap. 33), pode envolver a inserção, deleção ou conversão de nucleotídios na molécula de RNA. Como o *splicing* alternativo, a substituição de um nucleotídio por outro pode resultar em diferenças tecido-específicas dos transcritos. Por exemplo, *APOB*, o gene da apolipoproteína B humana (apoB), um componente da lipoproteína de baixa densidade (LDL), codifica um transcrito de mRNA de 14,1 kb, no fígado, e um produto proteico com 4.536 aminoácidos, a apoB100 (Cap. 18). No entanto, no intestino delgado, o mRNA é traduzido em um produto proteico, chamado apoB48, que tem 2.152 aminoácidos (aproximadamente 48% de 4.536), com aminoácidos idênticos aos primeiros 2.152 aminoácidos da apoB100. A diferença no tamanho da proteína ocorre porque, no intestino delgado, o nucleotídio 6666 é "editado" pela desaminação de um único resíduo de citidina, convertendo-o em um resíduo de uridina. A mudança resultante, de uma glutamina para um códon de parada, causa o término prematuro, produzindo apoB48 no intestino (Fig. 35.7).

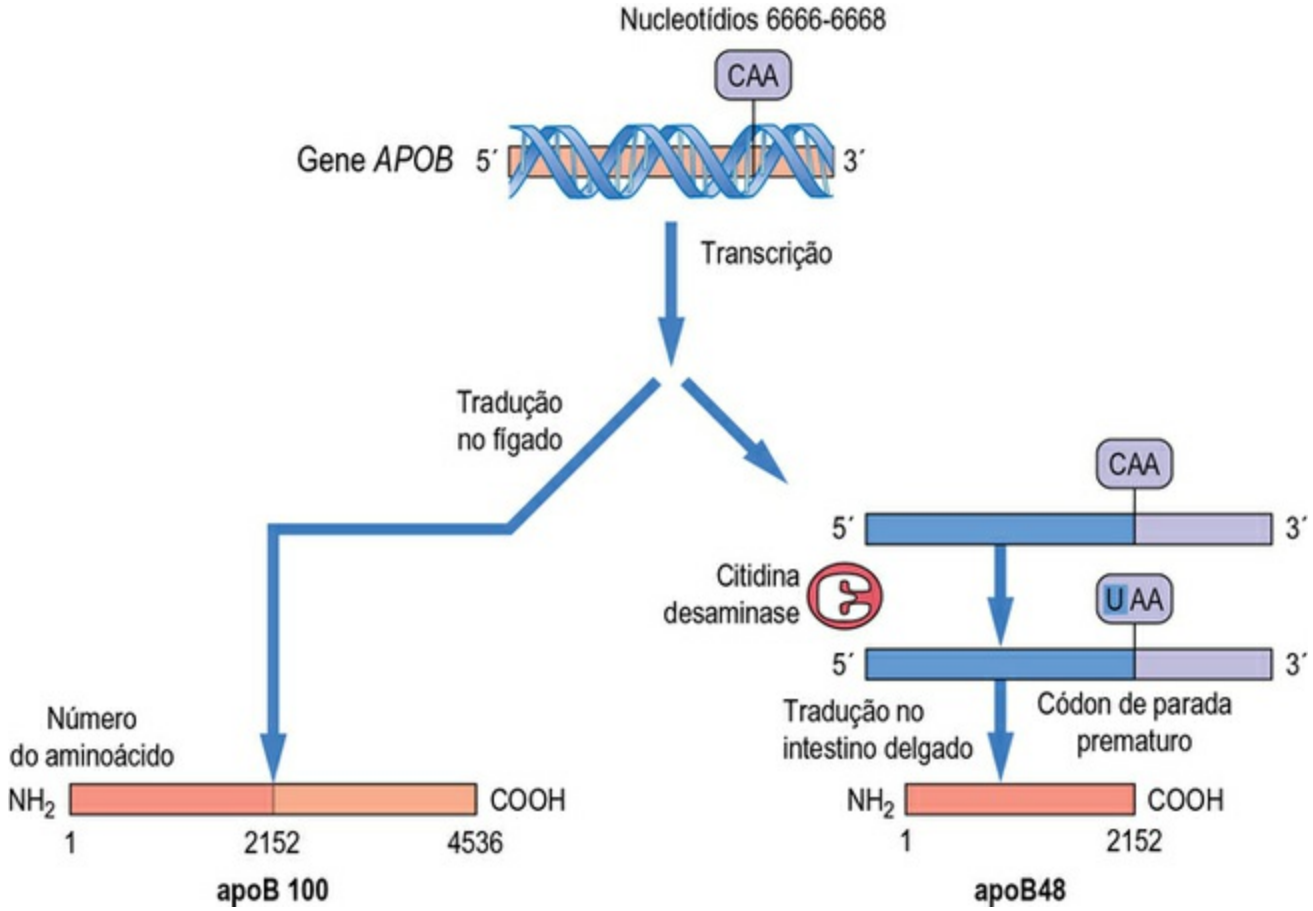


FIG. 35.7 Edição do RNA do gene *APOB* em seres humanos origina transcritos tecido-específicos. No intestino delgado, o nucleotídio 6666 do mRNA de apoB é convertido de uma citosina em uracil pela ação da enzima citidina desaminase. Essa mudança converte um códon da glutamina no mRNA de apoB100 em um códon de parada prematuro e, quando o mRNA é traduzido, o produto truncado, apoB48, é produzido (Cap. 18).

Além desta citidina desaminase, existem outras enzimas que modificam outros mRNAs antes da tradução, como as ***a*denosina *d*esaminases que *a*tuam sobre o *R*NA (ADARs)**. A ADAR1 catalisa a desaminação de resíduos de adenosina em inosina nos dsRNAs; a edição de RNA é essencial para o desenvolvimento de células-tronco hematopoiéticas, e mutações nessa enzima, em ratos, causa morte embrionária precoce. A ADAR2 modifica um mRNA de receptor de glutamato neuronal, o que resulta na alteração de um único aminoácido requerido para a função do receptor; a deficiência dessa enzima conduz a convulsões e morte neonatal em ratos.

RNA de interferência

O RNA de interferência (RNAi), discutido em mais detalhe no Capítulo 33, é outra maneira de controlar a expressão gênica. No centro dos RNAis estão os RNAs não codificadores muito pequenos, com cerca de 20-30 nucleotídios, chamados micro-RNAs (miRNAs), os quais estão envolvidos na atenuação ou repressão da tradução por ligação ao 3′ UTR de um mRNA e fatores de recrutamento que inibem a síntese de proteína, ou pela destruição do mRNA por uma via alternativa. Durante a embriogênese e em certos estados patológicos, como o câncer, existem alterações no padrão da expressão de miRNA em células, alterando dessa forma a expressão gênica de formas que poderão modificar o

destino celular ou favorecer a proliferação celular. O RNAi representa uma grande promessa no tratamento de doenças humanas, em que a inibição da expressão de um produto gênico ou a destruição do RNA seria terapêutica, como nas infecções virais ou no câncer.

Quadro clínico

O *status* de ferro regula a tradução de uma proteína transportadora de ferro: um homem ofegante e fatigado

Um homem caucasiano com 57 anos consultou seu médico com queixa de falta de ar e fadiga. Ele notou que sua pele estava mais escura. A avaliação clínica indicou falha cardíaca com comprometimento da função ventricular esquerda como resultado de cardiomiopatia dilatada, uma concentração sérica baixa de testosterona e uma concentração elevada de glicose em jejum. A concentração de ferritina sérica estava bastante aumentada, > 300 μg/L e suspeitou-se do diagnóstico de hemocromatose hereditária. O homem foi tratado por flebotomia regular até sua ferritina sérica ser < 20 μg/L (valor normal 30-200 μg/L), ponto no qual o intervalo da flebotomia foi aumentado para manter a concentração de ferritina sérica em valores < 50 μg/L.

Comentários

Em condições de excesso de ferro, como, por exemplo, na hemocromatose, existe um aumento da síntese de ferritina, uma proteína de ligação e armazenamento do ferro. Ao contrário, em condições de deficiência de ferro, existe um aumento da síntese da proteína receptora de transferrina, que está envolvida na internalização do ferro. Em ambos os casos, as moléculas de RNA estão inalteradas e não existe mudança na síntese dos respectivos mRNAs. Entretanto, tanto o mRNA da ferritina quanto o mRNA do receptor da transferrina contêm uma sequência específica conhecida como elemento de resposta ao ferro (IRE). Uma proteína específica de ligação ao IRE pode se ligar ao mRNA. Em deficiência de ferro, a proteína de ligação ao IRE se liga ao mRNA da ferritina, impedindo a tradução da ferritina, liga-se ao mRNA do receptor da transferrina e impede sua degradação. Portanto, em deficiência de ferro, as concentrações de ferritina são baixas e as de receptor de transferrina são altas. Em estados de excesso de ferro, o processo inverso ocorre, e a tradução do mRNA de ferritina aumenta, o mRNA do receptor da transferrina sofre degradação, as concentrações de ferritina sérica são altas e as concentrações do receptor de transferrina são baixas (Fig. 35.8). Cerca de 10% da população dos Estados Unidos são portadores do gene da hemocromatose hereditária, mas somente homozigotos são afetados pela doença. (Ver também discussão do metabolismo do ferro e hemocromatose no Capítulo 22.)

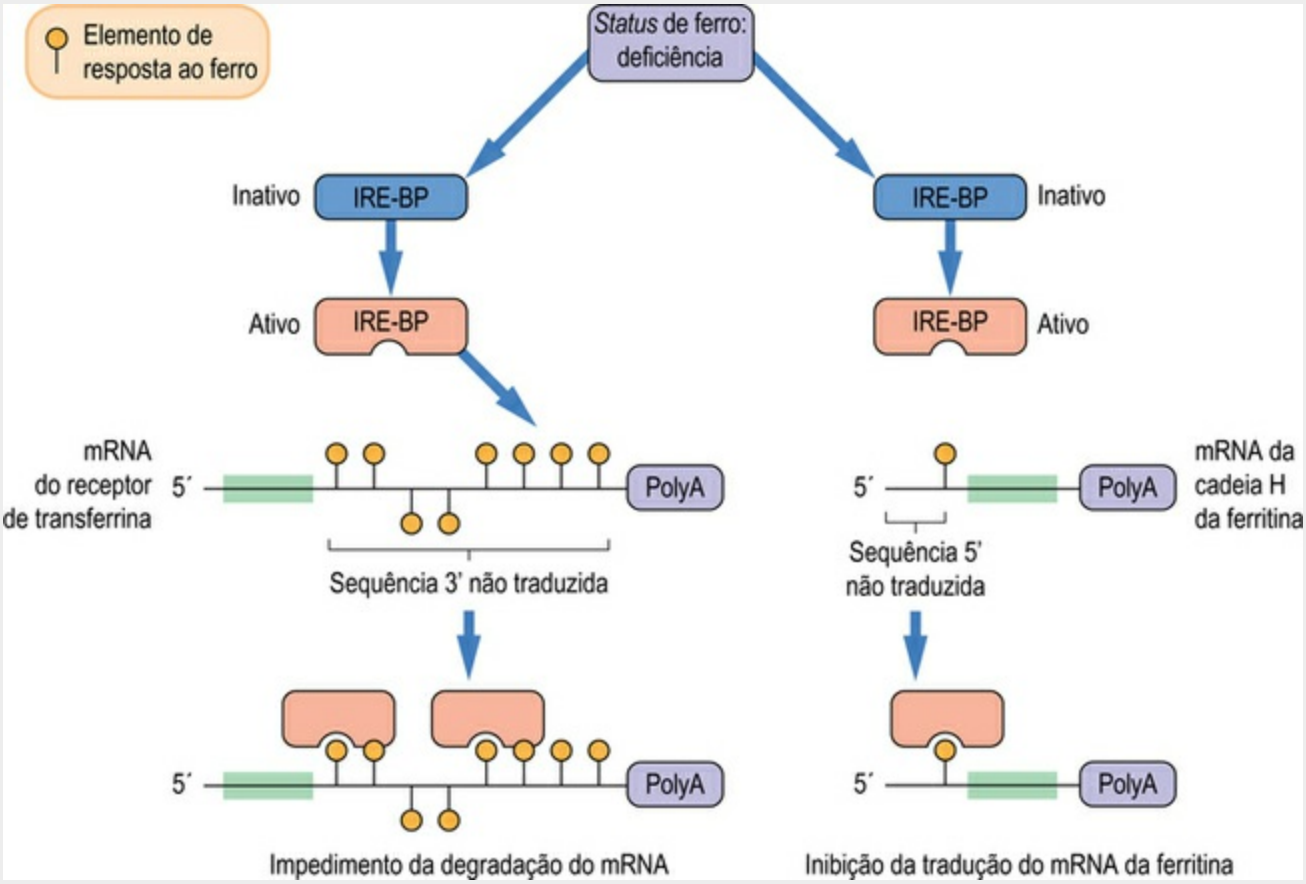


FIG. 35.8 Regulação da tradução do mRNA por *status* de ferro. A ligação de uma proteína de ligação específica ao elemento de resposta ao ferro (IRE) do mRNA de genes que respondem ao ferro pode alterar a tradução do mRNA em proteínas funcionantes de diferentes maneiras. Quando o ferro é deficiente, a proteína que se liga ao elemento de resposta ao ferro (IRE-BP) é ativada e pode se ligar ao terminal 3' do mRNA do receptor de transferrina. Isso impede a degradação do mRNA, portanto aumenta a quantidade de receptor de transferrina que pode ser feita (*esquerda*) e, assim, aumenta a quantidade de ferro que o receptor pode entregar para a célula. Entretanto a IRE-BP também se liga ao terminal 5' do mRNA da ferritina e impede sua tradução (*direita*). A ferritina é uma proteína que sequestra e armazena ferro no citoplasma, e uma quantidade menor é necessária em momentos de deficiência de ferro (ver também Figura 22.8).

Ativação preferencial de um alelo de um gene

Os genes humanos são bialélicos, mas por vezes apenas um alelo do gene é expresso

O complemento normal dos cromossomos humanos compreende 22 pares de autossomos e dois cromossomos sexuais. Em cada um dos pares de autossomos, os genes estão presentes em ambos os cromossomos: eles são bialélicos. Em condições normais, ambos os genes são expressos sem que seja dada preferência para um ou outro alelo do gene – isto é, ambas as cópias, paterna e materna, do gene podem ser expressas, a menos que exista uma mutação em um alelo que impeça que isto aconteça.

A situação com respeito aos cromossomos sexuais é levemente diferente. Os cromossomos sexuais são de dois tipos, X e Y, sendo o X substancialmente maior do que o Y. As mulheres têm dois cromossomos X, enquanto os homens têm um cromossomo X e um Y. Uma região do cromossomo Y é idêntica a uma região do cromossomo X, mas o

cromossomo X também contém genes que não têm um par correspondente no cromossomo Y, e alguns genes no cromossomo Y são específicos para o cromossomo Y, como, por exemplo, SRY, um gene determinante do sexo. Esses genes são denominados monoalélicos; eles não oferecem opção sobre que alelo do gene será expresso.

Além dos casos específicos dos cromossomos sexuais, parece não haver razão para que ambos os alelos de um gene não possam ser expressos. Entretanto, em seres humanos, os genes bialélicos têm sido identificados, mas somente um alelo – materno ou paterno – é preferencialmente expresso, a despeito do fato de ambos serem perfeitamente normais ou idênticos. Como resultado, somente 50% do produto gênico é produzido, mas o produto é funcionalmente ativo. Conforme descrito na Tabela 35.2, três diferentes mecanismos que podem restringir a expressão dos genes bialélicos em seres humanos têm sido identificados (Tabela 35.2).

Tabela 35.2

Exemplos de tipos de restrição de genes bialélicos em seres humanos

Imprinting genômico	Nos genes autossômicos, o *imprinting* pode ser tecido-específico – expressão monoalélica em alguns tecidos, bialélica em outros. Exemplos incluem o fator de crescimento 2 semelhante à insulina (IGF-2) e o gene de suscetibilidade ao tumor de Wilms (WT1)
Exclusão alélica	Produção tecido-específica de um único produto alélico, como, por exemplo, a síntese de uma única cadeia leve ou pesada de imunoglobulina, em uma célula B, a partir de apenas um alelo
Inativação do cromossomo X	Alguns genes no cromossomo X em mulheres. Os homens exibem somente um alelo do gene X ligado, mas as mulheres têm dois, e um é inativado por repressão de aproximadamente todo o cromossomo X

Para alguns genes, embora os dois alelos existam em qualquer célula em particular, somente um deles é ativo, portanto o gene se comporta como se fosse monoalélico, embora de fato seja bialélico.



Quadro de conceitos avançados

Inativação do cromossomo X

Os homens têm um cromossomo X, enquanto as mulheres têm dois, portanto os genes no cromossomo X são bialélilcos nas mulheres, mas monoalélicos nos homens. Nas mulheres, entretanto, um dos cromossomos X em cada célula é inativado em um estágio inicial da embriogênese. O X inativado pode ser o cromossomo X herdado do pai ou da mãe; para qualquer célula em particular, a inativação é ao acaso, mas os descendentes dessa célula terão o mesmo X inativado. Entretanto, o cromossomo X inativado pode ainda expressar alguns genes, incluindo o XIST (transcrito específico do X inativo-Xi), que codifica um RNA que desempenha uma função importante na inativação do cromossomo X. A metilação das ilhas CpG ocorre na maioria dos genes do cromossomo inativado, o que reprime a transcrição. O cromossomo X inativado é reativado durante a ovogênese nas mulheres.

Questões para aprendizagem

1. Como os elementos de resposta a esteroides são identificados no genoma? Discuta as consequências de uma mutação em um SRE *versus* uma mutação na proteína que se liga ao SRE. De que forma a proteína de dedo de zinco para o receptor de glicocorticoides difere daquela para o receptor de androgênios ou estrogênios?
2. Quais são as consequências bioquímicas da edição do gene *APOB* em seres humanos? Compare os efeitos da edição ao se introduzir uma substituição, em comparação com uma inserção ou uma deleção, em uma molécula de mRNA.
3. Alguns genes têm promotores que não têm TATA box (genes sem TATA). Sem esta box, o que determina onde o complexo RNAPol II iniciará a transcrição?
4. Compare o número total de genes com o número de proteínas traduzidas que podem ser sintetizadas pelo genoma humano. Que fração dos genes codifica os fatores de transcrição? Compare a concentração dos fatores de transcrição com a concentração de enzimas glicolíticas na célula.

Resumo

- O controle da expressão gênica envolve ambos os eventos transcricionais e pós-transcricionais que regulam a expressão de um gene tanto no tempo quanto no espaço e em resposta a inúmeros sinais de desenvolvimento, hormonais e de estresse.
- As sequências de DNA e as proteínas que se ligam ao DNA controlam a expressão gênica. As sequências de DNA incluem os promotores de ação *cis*, como o TATA box, e os acentuadores e elementos de resposta.
- As proteínas de ligação ao DNA são fatores de transcrição de ação *trans* que se ligam com alta especificidade a essas sequências e facilitam a ligação e o posicionamento da RNAPol II para a síntese de pré-mRNA.
- Outros fatores que afetam a conversão do gene em proteína envolvem o acesso do aparato transcricional ao gene, a modificação enzimática de histonas e nucleotídios no DNA, fatores que realizam o *splicing* alternativo de íntrons, edição pós-transcricional do pré-mRNA, RNA de interferência e expressão restrita de genes bialélicos.

Leituras sugeridas

Barres, R., Yan, J., Egan, B., et al. Acute exercise remodels promoter methylation in human skeletal muscle. *Cell Metabolism*. 2012; 15:405–411.

Berkhout, B., Jeang, K. T. RISCy business: microRNAs, pathogenesis, and viruses. *J Biol Chem*. 2007; 282:26641–26645.

Brena, R. M., Costello, J. F. Genome-epigenome interactions in cancer. *Hum Mol Genet*. 2007; 16:R96–R105.

Glaser, K. B. HDAC inhibitors: clinical update and mechanism-based potential. *Biochem Pharmacol*. 2007; 74:659–671.

Goodrich, J. A., Tjian, R. Unexpected roles for core promoter factors in cell-type specific transcription and gene regulation. *Nat Rev Genet*. 2010; 11:549–558.

Kaelin, W. G. Use and abuse of RNAi to study mammalian gene function. *Science*. 2012; 337:421–422.

Iijima, T., Wu, K., Witte, H., et al. SAM68 regulates neuronal activity-dependent alternative splicing of neurexin-1. *Cell*.

2011; 147:1601–1614.

Li, Q., Lee, J.-A., Black, D. L. Neuronal regulation of alternative pre-mRNA splicing. *Nature Rev Neurosci*. 2007; 8:819–831.

Nishikura, K. Functions and regulation of RNA editing by ADAR deaminases. *Annu Rev Biochem*. 2010; 79:321–349.

Oakley, R. H., Cidlowski, J. A. Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids. *J Biol Chem*. 2011; 286:3177–3184.

Wang, E. T., Sandberg, R., Luo, S., et al. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature*. 2008; 456:470–476.

Witt, O., Deubzer, H. E., Milde, T., et al. HDAC family: what are the cancer relevant targets? *Cancer Letts*. 2009; 277:8–21.

Sites

Alternate splicing: www.ensembl.org/info/docs/genebuild/ase_annotation.html

Catalog of genetic diseases: www.ncbi.nlm.nih.gov/omim

Epigenetics: http://epigenie.com/

Genomic imprinting: www.geneimprint.com/site/home

Noncoding RNA:

RNA editing: http://dna.kdna.ucla.edu/rna/index.aspx

RNA interference: www.rnaiweb.com/

www.eurasnet.info/tools/asdatabases

www.mirbase.org

www.noncode.org

CAPÍTULO 36

Regulação da Expressão Gênica: Genômica, Proteômica e Metabolômica

Andrew R. Pitt and Walter Kolch

Objetivos

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever o significado dos termos genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica.
- Discutir as diferenças entre os métodos das -ômicas e seus desafios particulares.
- Descrever a estrutura de um gene e a regulação da transcrição gênica.
- Fornecer diversos exemplos de métodos usados em genômica e transcriptômica.
- Dar exemplos de métodos usados em proteômica.
- Descrever os métodos usados na metabolômica.
- Discutir os biomarcadores.

Introdução

O genoma humano está organizado em 46 cromossomos, incluindo 22 pares de cromossomos autossômicos, que são compartilhados por ambos os sexos, e os cromossomos X e Y, que determinam o sexo. Cada progenitor vai doar um conjunto de cromossomos autossômicos. A mãe contribui com um cromossomo X e o pai com outro cromossomo, X ou Y. A maioria dos genes de mamíferos engloba múltiplos éxons, que são as partes que eventualmente vão constituir o mRNA maduro, e íntrons, que separam os éxons e são removidos do transcrito primário pelo *splicing*.

Muitas das funções biologicamente complexas são geradas pela interação entre genes, e não por genes individuais

Surpreendentemente, os 3 bilhões de bases do genoma humano apenas constituem

22.000-24.000 genes codificadores de proteínas. Este número de genes é somente quatro vezes superior ao dos fungos e duas vezes superior ao da mosca da fruta *Drosophila melanogaster,* e inferior ao de muitas plantas. Assim, muitas das funções biologicamente complexas que caracterizam os humanos são geradas pela **interação combinatória entre genes** em vez de serem genes individuais responsáveis por uma função específica. Esta percepção substituiu o dogma de que um gene codifica uma proteína com uma função. As células dos mamíferos usam o ***splicing* alternativo** e promotores gênicos alternativos para produzir de 4 a 6 mRNA diferentes a partir de um único gene, pelo que o número de mRNAs codificadores de proteínas, ou seja, o transcriptoma, pode chegar a 100.000.

As modificações pós-traducionais acrescentam níveis superiores de complexidade

A complexidade aumenta ainda mais ao nível proteico devido a modificações pós-traducionais e proteólises específicas que poderiam gerar um número estimado de entidades proteicas funcionalmente diferentes de 500.000 a 1.000.000, que corresponde ao proteoma. Cerca de 10-15% dessas proteínas têm um papel no metabolismo, termo que descreve coletivamente os processos usados para providenciar energia e os blocos de construção básicos de baixo peso molecular das células, tais como aminoácidos, ácidos graxos e açúcares. Também inclui os processos que convertem substâncias exógenas, tais como fármacos ou químicos ambientais.

A base de dados do metaboloma humano (www.hmdb.ca/) contém atualmente mais de 40.000 registros. A dimensão real do metaboloma é desconhecida, mas é expectável que aumente com o número de substâncias ambientais a que um organismo é exposto. A relação entre os diferentes -omas está ilustrada na Figura 36.1.

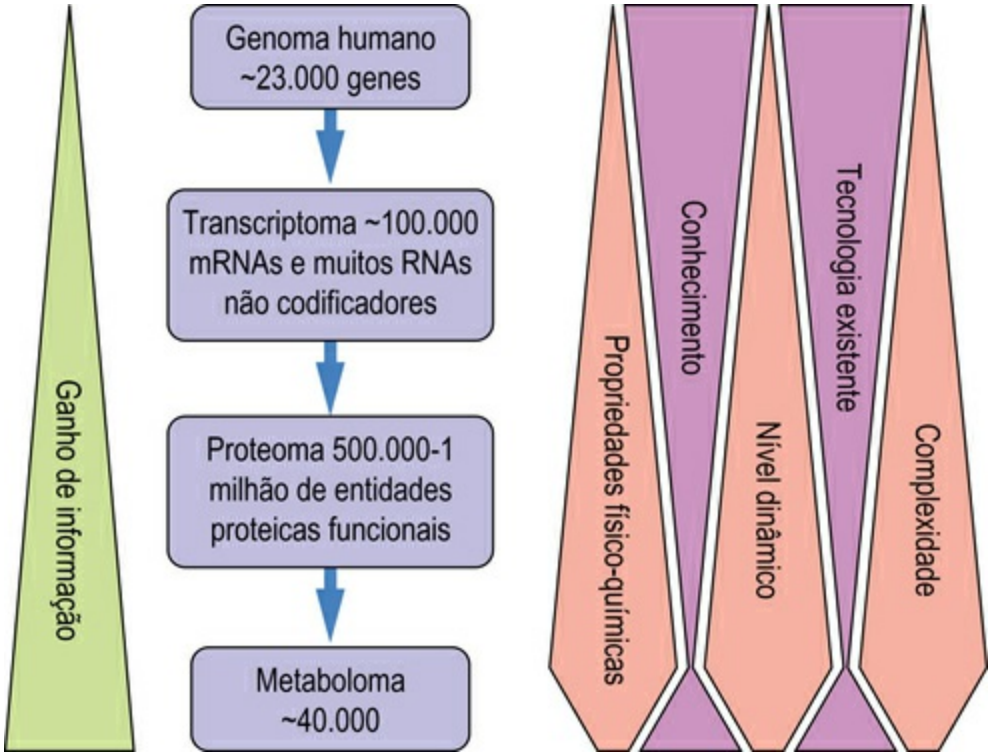


FIG. 36.1 Relação entre as -ômicas. A complexidade, a diversidade das propriedades físico-químicas e a gama dinâmica aumentam à medida que passamos dos genes para os transcritos e proteínas, mas podem diminuir novamente ao nível dos metabólitos. Isto representa um enorme desafio tecnológico, mas também uma rica fonte de ganho de informação, especialmente se as diferentes disciplinas das -ômicas puderem ser integradas em uma visão comum.

Os estudos do genoma, transcriptoma, proteoma e metaboloma apresentam diferentes desafios

O genoma e o transcriptoma são constituídos inteiramente por DNA e RNA, respectivamente. Suas propriedades físico-químicas uniformes têm permitido o desenvolvimento de métodos eficientes e cada vez mais baratos para amplificação, síntese, sequenciamento e análise por multiplexação. O proteoma e o metaboloma apresentam maiores desafios analíticos, pois consistem em moléculas com propriedades físico-químicas bastante diferentes e abundância muito variável. Por exemplo, a concentração de proteínas no soro humano alcança 12 ordens de magnitude, enquanto que, em condições normais, os genes são igualmente abundantes. O genoma é relativamente estático, enquanto o transcriptoma e o proteoma são mais dinâmicos e podem mudar rapidamente em resposta a estímulos externos e internos. As respostas dinâmicas mais pronunciadas podem manifestar-se no metaboloma, já que este reflete diretamente as interações entre o organismo e o ambiente. Assim, a complexidade aumenta à medida que passamos do genoma para o transcriptoma, proteoma e metaboloma, e paralelamente o nosso conhecimento diminui. A análise de todos os dados das -ômicas requer elevados e sofisticados recursos bioinformáticos, e também tem estimulado o desenvolvimento da **biologia de sistemas,** que usa modelos matemáticos e computacionais para a interpretação da informação funcional acerca dos processos biológicos contida nestes dados.

Genômica

A análise do genoma faculta uma forma de predizer a probabilidade de uma condição, mas sem dar informações sobre se e quando essa probabilidade se manifestará realmente

A informação sobre "se e quando" pode ser melhor obtida pelo transcriptoma, proteoma e metaboloma. Estes últimos fornecem um panorama dinâmico do estado atual de um organismo e permitem a monitorização das alterações nesse estado, por exemplo, durante a progressão da doença ou durante o tratamento. Assim, a informação fornecida pelas tecnologias das -ômicas é complementar e seu uso para propósitos de diagnóstico é particularmente limitado pela complexidade do equipamento e da análise. A genômica e a transcriptômica estão cada vez mais disponíveis nos laboratórios clínicos e preparam-se para se tornar parte dos testes diagnósticos de rotina nos próximos anos.

Muitas doenças apresentam um componente genético hereditário

Muitas doenças são provocadas por aberrações genéticas, e muitas outras manifestam uma predisposição ou componente genético. O banco de dados Online Mendelian Inheritance in Man ou Hereditariedade Mendeliana em Humanos (OMIM), disponível na internet (www.omim.org/), contém atualmente mais de 2.800 mutações genéticas associadas a mais de 4.700 fenótipos que causam ou predispõem à doença. Estes números sugerem que muitas doenças são causadas por mutações em genes individuais e que muitas mais possuem um componente genético hereditário. Assim, o genoma consiste em uma rica fonte de informação acerca da nossa fisiologia e fisiopatologia. Atualmente possuímos à nossa disposição um vasto arsenal de técnicas para a análise do genoma, que permitem a detecção de anomalias grosseiras até alterações em um nucleotídio individual, as quais deverão ser cada vez mais utilizadas para o diagnóstico clínico.



Quadro de conceitos avançados

O projeto genoma humano

O Projeto Genoma Humano (HGP) teve início oficialmente em 1990 e culminou com a publicação da sequência completa em bases de dados públicas em 2003. Contudo, análise e interpretação mais aprofundadas dos dados terão continuidade ainda por muito mais tempo. O HGP foi único em diversos aspectos. Foi o primeiro projeto global de ciências da vida, coordenado pelo Department of Energy e pelo National Institutes of Health (EUA). O Wellcome Trust (Reino Unido) tornou-se um grande parceiro em 1992 e outras contribuições significativas foram feitas pelo Japão, França, Alemanha, China e outros países. Mais de 2.800 cientistas de 20 instituições por todo o mundo contribuíram para o artigo que descreve a sequência final em 2004. O projeto também foi conduzido em escala industrial, com logísticas e organização em estilo industrial. De fato, o HGP enfrentou competição da Celera Genomics, uma companhia privada, fundada em 1998, e os primeiros esboços das sequências do genoma humano

foram publicados em dois artigos paralelos em 2001. O HGP usou uma **abordagem "clone a clone",** em que o genoma foi inicialmente clonado e depois os grandes clones foram divididos em porções menores **e** sequenciados. A Celera seguiu uma estratégia fundamentalmente diferente: o **sequenciamento por fragmentação aleatória *(shotgun)***, em que todo o genoma é fragmentado em pequenas porções que podem ser sequenciadas diretamente, sendo a sequência completa ordenada posteriormente. Essa abordagem é muito mais rápida, mas menos fiável na produção de sequências contínuas, e muito menos apta a corrigir lacunas na sequência final reunida. Os esboços do genoma de 2001 estimavam a existência de 30.000-35.000 genes. A sequência aperfeiçoada do HGP de 2003 confirmou a existência de 19.599 genes codificadores de proteínas e identificou outros 2.188 genes previstos de DNA, um número surpreendentemente baixo. Estes genes estão englobados em 2,85 bilhões de nucleotídios que cobrem mais de 99% da eucromatina, ou seja, o DNA que contém os genes. Muitos milhares de genomas têm sido sequenciados desde então, e o genoma de referência humano é constantemente atualizado. Até 2010 existem somente cerca de 250 lacunas, se comparado com as 150.000 presentes no esboço da sequência, e a sequência atual é extremamente precisa. As sequências do genoma estão acessíveis publicamente por meio das principais bases de dados de nucleotídios.

Cariotipagem, hibridização genômica comparativa (CGH), análise de microarranjo cromossômico (CMA) e hibridização in situ por fluorescência (FISH)

A cariotipagem avalia a arquitetura cromossômica global

Entre os primeiros sucessos na exploração da informação do genoma para o diagnóstico das doenças humanas está a descoberta da trissomia do 21 como causa da **síndrome de Down,** em 1959, e a descoberta do **cromossomo Filadélfia,** associado a **leucemia mieloide crônica** (LMC), em 1960. Desde então, a cariotipagem identificou um grande número de aberrações cromossômicas, incluindo amplificações, deleções e translocações, especialmente em tumores. O método se baseia na simples coloração dos cromossomos com Giemsa ou com outros corantes, que revelam o padrão de bandas característico para cada cromossomo visível pela microsopia de luz. Apesar de revelar somente informações básicas, como número, forma e alterações grosseiras da arquitetura geral do cromossomo, é ainda assim um dos pilares da análise genética clínica.

A hibridização genômica comparativa compara dois genomas de interesse

Uma refinação da cariotipagem é a **hibridização genômica comparativa (CGH).** O princípio da CGH é comparar dois genomas de interesse, geralmente um doente em relação a um genoma de controle normal. Os genomas a serem comparados são marcados com dois corantes fluorescentes diferentes. Os DNAs marcados com fluorescente são então hibridizados com um conjunto de cromossomos normais e

avaliados por análise quantitativa de imagem (Fig. 36.2). Como a fluorescência apresenta uma ampla gama dinâmica (i.e., a relação entre a intensidade da fluorescência e a concentração da sonda é linear ao longo de um amplo intervalo), a CGH pode detectar ganhos ou perdas regionais nos cromossomos com muito maior precisão e resolução do que a cariotipagem convencional. Perdas de 5 a 10 megabases (Mb) e amplificações <1 Mb são detectáveis por CGH. No entanto, alterações balanceadas, como inversões ou translocações balanceadas, escapam à detecção, já que não alteram nem o número de cópias nem a intensidade da hibridização.

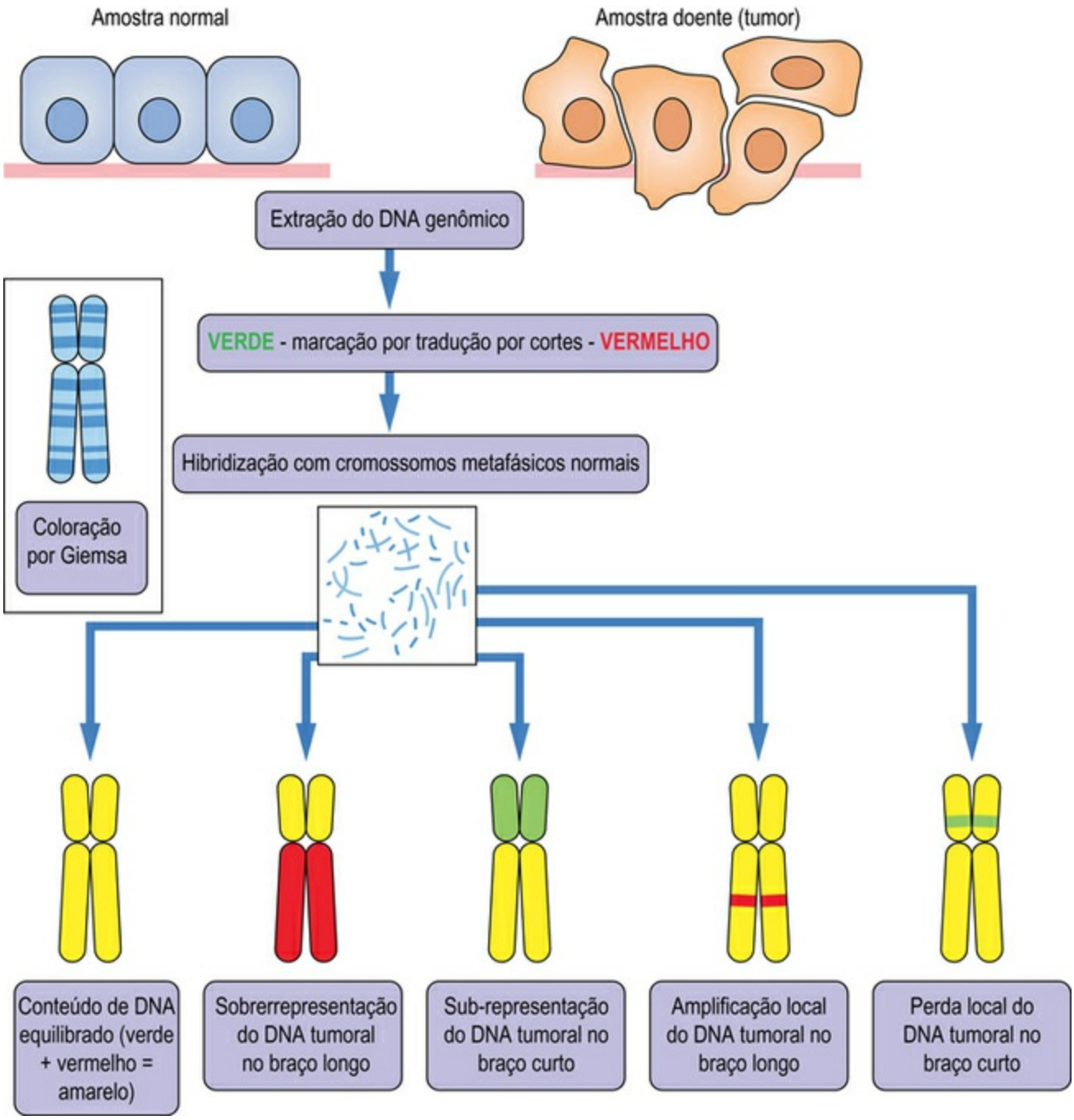


FIG. 36.2 Princípios da hibridização genômica comparativa (CGH). O DNA do genoma é isolado a partir de uma amostra normal e de uma doente (neste caso, um tumor) para serem comparadas. O DNA é marcado por meio da tradução por cortes *(nick translation)* com corantes fluorescentes verde ou vermelho e hibridizado com um conjunto de cromossomos normais. Se o conteúdo de DNA entre as amostras for equilibrado, quantidades iguais do DNA do controle (verde) e do tumor (vermelho) vão hibridizar, resultando em uma coloração amarela. Amplificações globais ou locais, ou perda de material genético, vão se revelar por um desequilíbrio na coloração.

Na análise cromossômica por microarranjos, o DNA marcado é hibridizado com um arranjo de oligonucleotídios

Progressos adicionais na resolução são proporcionados pela **análise cromossômica por microarranjos (CMA).** Neste método, o DNA marcado é hibridizado com um arranjo de oligonucleotídios. Métodos modernos para a síntese de oligonucleotídios e para a produção de arranjos permitem a formação de arranjos com vários milhões de oligonucleotídios em *chips* do tamanho de uma lâmina microscópica. Ao escolher os

oligonucleotídios de maneira que cubram a região de interesse de forma regular e igual pode ser atingida uma resolução muita alta, permitindo a detecção de alterações no número de cópias na ordem dos 5-10 kb no genoma humano. A CMA é utilizada no **rastreio pré-natal para a detecção de defeitos cromossômicos.** Uma vez que a sonda de DNA pode ser amplificada pela reação em cadeia da polimerase (PCR; Fig. 36.3), apenas são necessárias pequenas quantidades de material inicial. Notavelmente, nem o CGH nem a CMA proporcionam informação sobre a ploidia. Se o conteúdo de DNA estiver equilibrado e não for portador de outras aberrações, um genoma tetraploide será indistinguível de um genoma diploide.

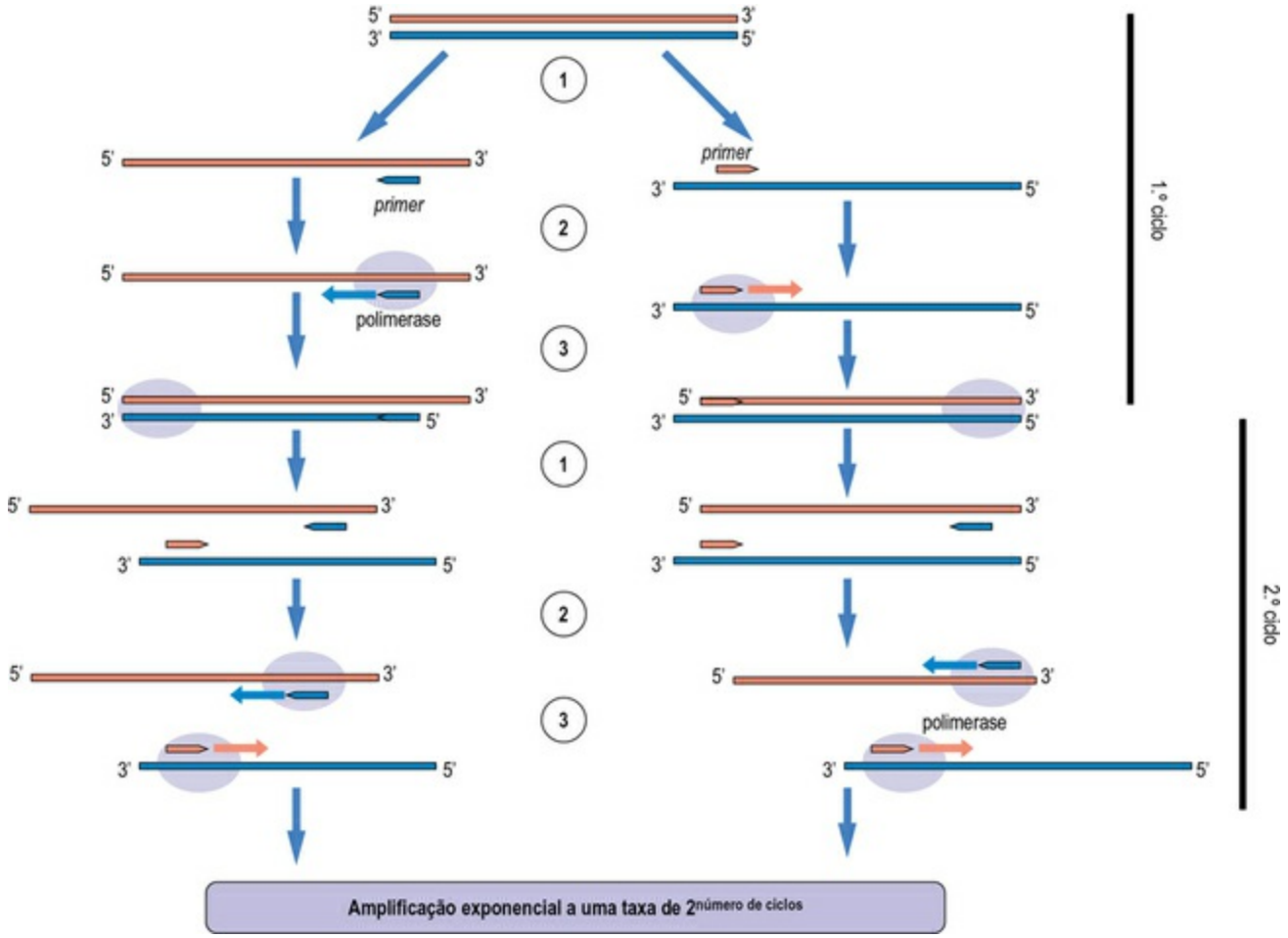


FIG. 36.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR). Esse método é amplamente utilizado para a amplificação do DNA e RNA. O molde de ácido nucleico é desnaturado por aquecimento, e iniciadores específicos *(primers)* são anelados pela diminuição da temperatura **(passo 1).** Os *primers* vão sofrer extensão pela ação da transcriptase reversa se o molde for RNA, ou da DNA polimerase se o molde for DNA **(passo 2).** O resultado é um produto de cadeia dupla **(passo 3),** que é aquecido e desnaturado para que o ciclo possa recomeçar. Tipicamente são usados entre 25 e 35 ciclos. A amplificação é exponencial, pelo que a PCR permite analisar quantidades diminutas de DNA ou RNA, compatíveis com os níveis de uma única célula. O uso de DNA polimerase com estabilidade térmica e de alta fidelidade permite a amplificação de fragmentos com comprimentos de vários milhares de pares de bases. Muitas variações da PCR foram desenvolvidas para uma ampla gama de aplicações, tais como a clonagem molecular, a mutagênese sítio-específica, a produção de sondas marcadas para experiências de hibridização, a quantificação da expressão de RNA, o sequenciamento do DNA, a genotipagem e muitas outras.

A hibridização por fluorescência in situ pode ser usada quando se conhece o gene

em questão

Se o gene de interesse já for conhecido, o repectivo DNA recombinante pode ser marcado e usado como sonda em extensões de cromossomos. Esse método é denominado **hibridização por fluorescência *in situ* (FISH)** e pode detectar amplificações ou deleções gênicas e translocações cromossômicas. Ao usar marcadores fluorescentes de cores diferentes, diversos genes podem ser corados simultaneamente.

As mutações genéticas podem ser estudadas pelo sequenciamento

Os esforços para identificar genes de doença individuais tiveram como obstáculo o conhecimento insuficiente do genoma e a ausência de métodos de mapeamento de alta resolução. Esta situação mudou drasticamente com a conclusão da sequência do genoma humano em 2003 e o rápido desenvolvimento de novas tecnologias, originando o **sequenciamento de nova geração (NGS)**, que tornou o sequenciamento muito rápido e acessível em termos financeiros.

Os quatro princípios do sequenciamento do DNA

Existem quatro princípios do sequenciamento do DNA. (i) O **método de Maxam-Gilbert**, que usa químicos para clivar o DNA em bases específicas e depois separa os fragmentos por meio de géis de alta resolução, permitindo que a sequência seja lida pelo tamanho dos fragmentos. (ii) O **método de Sanger**, que usa uma polimerase para sintetizar DNA na presença de pequenas quantidades de nucleotídios de terminação de cadeia (Fig. 36.4). Este método e o método de Maxam-Gilbert foram as primeiras técnicas de sequenciamento de DNA bem-sucedidas. Enquanto o último se tornou obsoleto, o método de Sanger é ainda muito utilizado. (iii) A medição da extensão da cadeia complementar do DNA quando o nucleotídio correspondente é adicionado. (iv) A monitorização da ligação de um oligonucleotídio sintético ao DNA-alvo que se pretende sequenciar, o que ocorre apenas quando os nucleotídios do oligonucleotídio encontram seus pares na sequência de DNA-alvo, na posição correta. Variações dos métodos ii-iv estão incorporadas nos fluxos de trabalho da NGS.

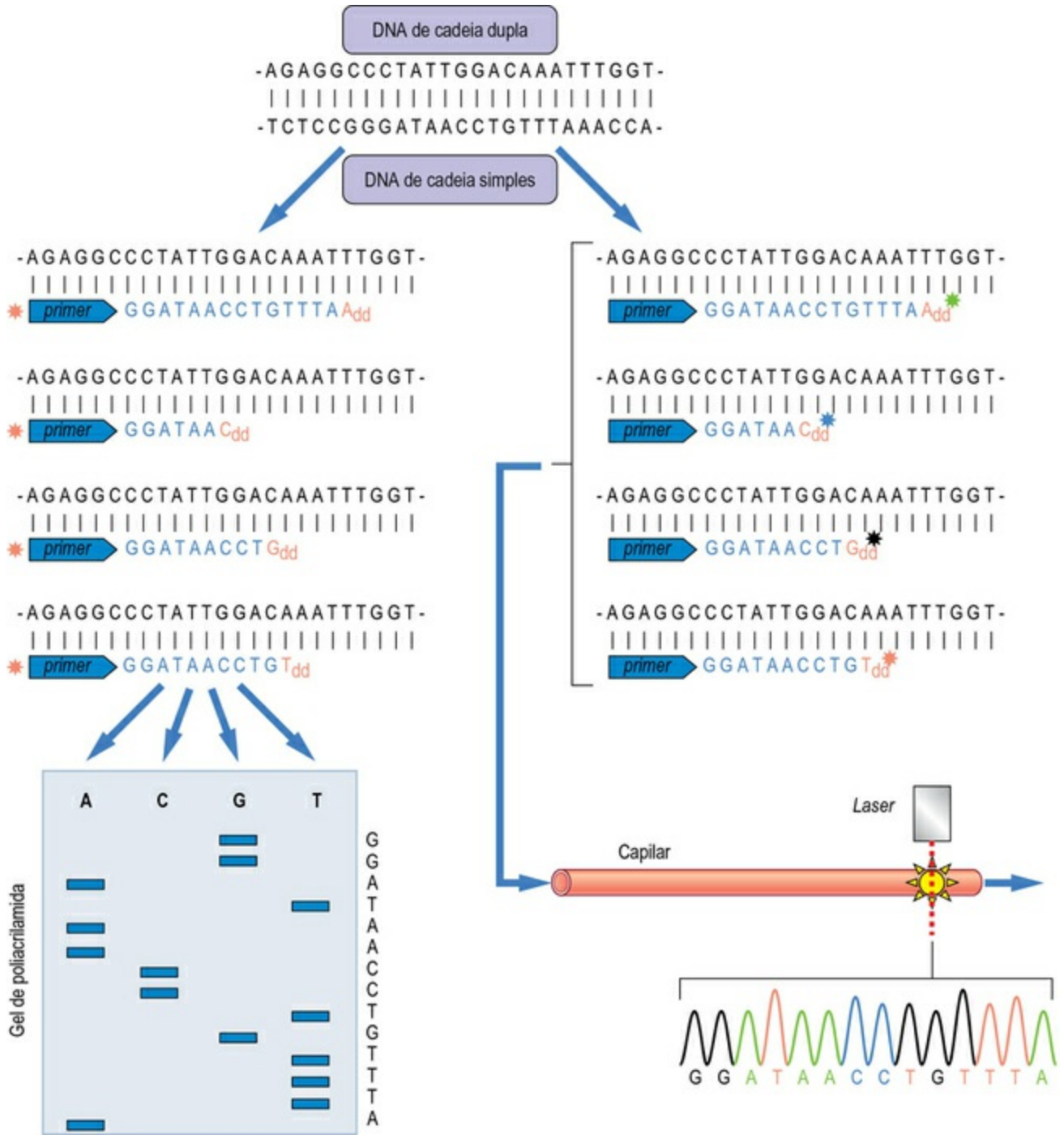


FIG. 36.4 Sequenciamento do DNA pelo método de terminação da cadeia de Sanger. O DNA de cadeia dupla é aquecido e desnaturado para originar DNA de cadeia simples. Os *primers* (geralmente hexâmeros de sequência aleatória) são anelados para gerar sítios de iniciação aleatórios para a síntese de DNA, que vai ocorrer na presença da DNA polimerase, de desoxinucleotídios (dNTPs) e de pequenas quantidades de didesoxinucleotídios (ddNTPs). Os ddNTPs não possuem o grupamento 3'-hidroxila, que é necessário para o alongamento da cadeia de DNA. Os ddNTPs finalizam a síntese produzindo fragmentos de diferentes tamanhos, cada um terminando com um nucleotídio específico. Esses fragmentos podem ser separados por eletroforese em gel de poliacrilamida, e a sequência pode ser lida a partir da "escada" de fragmentos no gel. Para visualizar os fragmentos, tanto o DNA pode ser marcado pela adição de dNTPs radioativos ou fluorescentes, como os *primers* podem ser marcados (como mostrado na figura) com um corante fluorescente. Ao usar ddNTPs marcados com corantes diferentes é possível que todas as quatro reações sejam misturadas e separadas depois por eletroforese capilar. A detecção a *laser* on-line permite a leitura direta da sequência. Este "sequenciamento capilar do DNA" proporciona leituras mais longas do que os géis, permite a multiplexação e tem um alto rendimento. Esse foi o método utilizado para a maioria do sequenciamento do Projeto Genoma Humano.

Existem múltiplos métodos de NGS que usam diferentes processos para decifrar a sequência de DNA

Todos os métodos de NGS partilham do princípio de conduzir muitos milhões de reações de sequenciamento paralelas em compartimentos microscópicos de matrizes ou nanoesferas. Estes fragmentos de sequência são organizados em sequências genômicas completas por métodos bioinformáticos sofisticados. Enquanto o primeiro sequenciamento do genoma humano teve um custo de 3 bilhões de dólares e demorou cerca de 10 anos para ficar concluído, graças à NGS é agora possível sequenciar o genoma humano em um único dia por aproximadamente 1.000 dólares. Assim, a NGS tem permitido a pesquisa em larga escala de mutações gênicas por sequenciamento direto. Exemplos notáveis destes projetos são os **Projetos do Genoma do Câncer,** executados pelo Wellcome Trust Sanger Centre, no Reino Unido, e pelo US National Cancer Institute. O objetivo destes projetos é estabelecer um mapa sistemático das mutações no câncer e utilizar esse mapa para a estratificação do risco, diagnóstico precoce e escolha do melhor tratamento para os pacientes.

Os polimorfismos de nucleotídio único (SNPs) são úteis na identificação e avaliação do risco de doenças

Os genomas em uma população variam ligeiramente por meio de pequenas alterações, que na sua maioria envolvem apenas nucleotídios individuais, denominadas **polimorfismos de nucleotídio único (SNPs).** O método mais comum para examinar SNPs é por sequenciamento direto ou por métodos com base em arranjos. No primeiro método, o DNA é geralmente amplificado por PCR e depois sequenciado. No segundo método, os arranjos de oligonucleotídios contendo todas as permutações possíveis de SNPs vão receber sondas de DNA genômico, de modo que a hibridização ocorre apenas quando as sequências de DNA correspondem exatamente.

O mapeamento sistemático dos SNPs tem-se mostrado útil no estudo da identidade e hereditariedade genética, e também na identificação e avaliação do risco de doenças genéticas

As sequências iniciais do genoma humano revelaram cerca de 2,5 milhões de SNPs, enquanto em 2012 mais de 180 milhões de SNPs estavam identificados. O **Internacional HapMap Project** (www.hapmap.org) cataloga sistematicamente as variações genéticas com base na análise em larga escala dos SNPs em 270 humanos de origem africana, chinesa, japonesa e caucasiana.

Estudos de associação de todo o genoma (GWAS) tentam relacionar a frequência de SNPs com o risco de doenças

Apesar de os estudos GWAS terem identificado novos genes envolvidos com doenças, como a doença de Crohn ou a degeneração macular relacionada com a idade, o baixo risco tipicamente associado a SNPs individuais dificulta estas correlações, especialmente

em doenças multigenéticas. Existe muito debate sobre se é possível ultrapassar essa limitação por meio da examinação de coortes muito grandes.

Alterações epigenéticas são traços hereditários que não se refletem na sequência de DNA

Apesar de o genoma, definido pela sua sequência de DNA, ser frequentemente considerado como material hereditário, existem também outros traços hereditários que não se refletem em alterações na sequência de DNA

Esses traços são denominados alterações epigenéticas (ver também Cap. 35 e Quadro da pág. 461). Incluem as **modificações das histonas, como a acetilação e a metilação**, que afetam a estrutura da cromatina. Outra modificação é a **metilação do próprio DNA,** que ocorre na posição N5 das citosinas, tipicamente no contexto da sequência CpG. A metilação dos agregados CpG, denominados ilhas de CpG, nos promotores dos genes pode interromper a expressão de um gene. Estes padrões de metilação podem ser herdados por um processo pouco compreendido, denominado *imprinting* genômico (Cap. 35). **Aberrações nos padrões de metilação dos genes podem causar doenças** e são comuns nos tumores humanos, frequentemente servindo para silenciar a expressão de genes supressores tumorais.

O mapeamento dos padrões de metilação de promotores é muito importante

Os métodos mais comuns para analisar a metilação do DNA se baseiam no fato de os bissulfitos converterem resíduos de citosina em uracilo, mas deixarem resíduos 5-metilcitosina intactos (Fig. 36.5). Essa alteração na sequência do DNA pode ser detectada por diversos métodos, inclusive pelo sequenciamento do DNA tratado em comparação com o não tratado, pela hibridização diferencial de oligonucleotídios que detectam especificamente o DNA mutado ou o DNA não alterado, ou por métodos com base em arranjos. Os últimos, de maneira similar à análise de SNP, também se baseiam na hibridização diferencial para identificar alterações induzidas por bissulfitos no DNA, mas devido à possibilidade de colocar milhões de sondas de oligonucleotídios em um arranjo, são capazes de examinar um elevado número de padrões de metilação simultaneamente. As principais limitações são a possibilidade de as modificações por bissulfitos serem incompletas, originando falso-positivos, e a grande degradação do DNA em geral, que ocorre devido às condições adversas durante a modificação por bissulfitos. Alguns métodos novos da NGS podem detectar a metilação do DNA diretamente, o que irá acelerar o progresso da epigenômica. **O epigenoma é mais variável entre indivíduos relativamente ao genoma.** Por conseguinte, vai exigir um esforço maior para o mapeamento sistemático, mas também contém mais informação individual que pode ser útil para a elaboração de abordagens personalizadas da medicina.

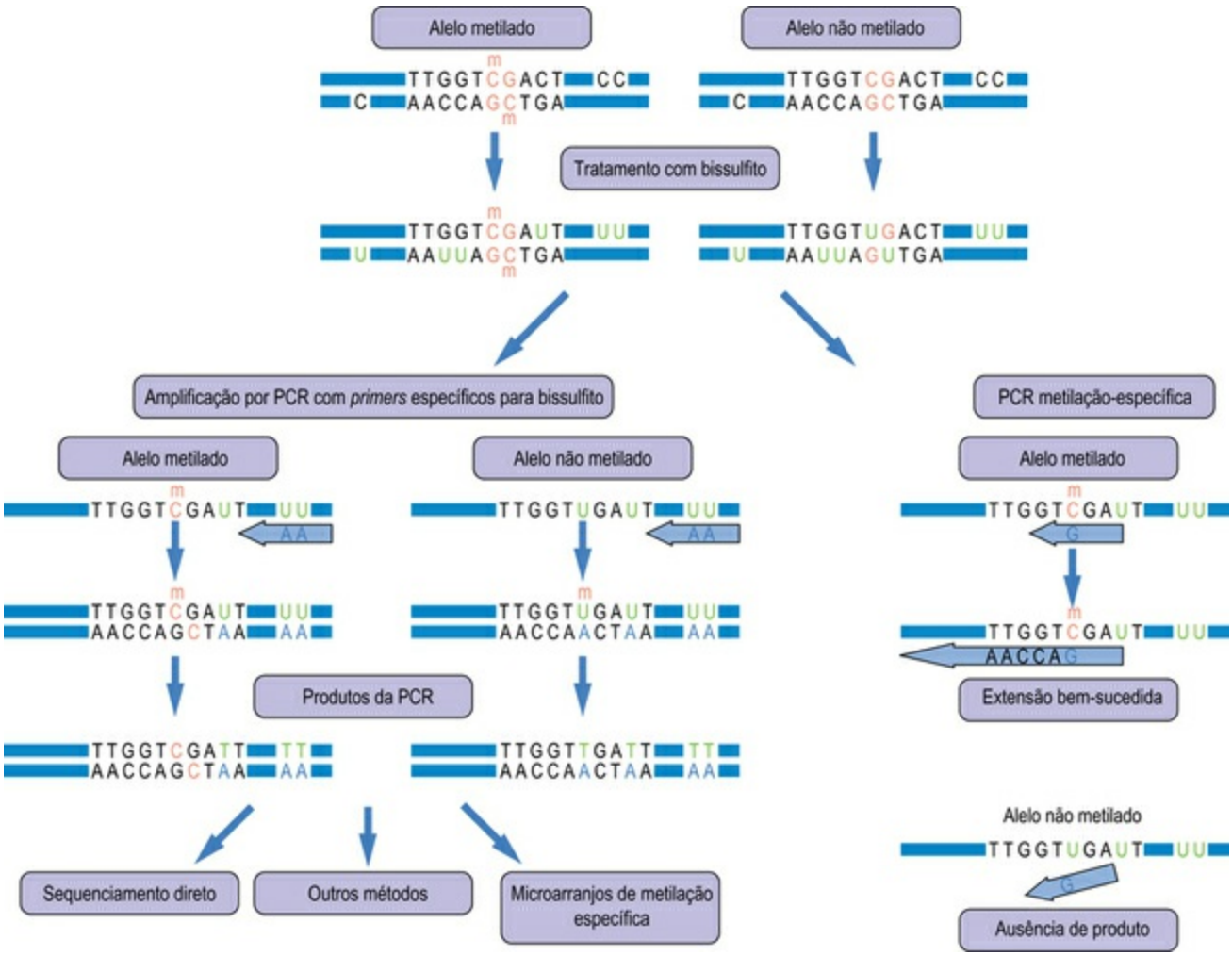


FIG. 36.5 Análise de metilação do DNA. A metilação do DNA ocorre tipicamente na citosina no contexto das "ilhas CpG" (representadas em laranja), que são abundantes nas regiões promotoras dos genes. O bissulfito converte os resíduos de citosina em uracila, mas não afeta os resíduos 5-metilcitosina. Isto provoca alterações na sequência de DNA que podem ser detectadas de diversas formas. Muitos métodos usam uma etapa de amplificação por PCR com *primers* que vão hibridizar seletivamente com o DNA modificado (painel à esquerda). Os produtos da PCR apresentam alterações características na sequência em que os pares de base citosina-guanosina não modificados são substituídos por timidina-adenosina, enquanto a sequência original é mantida quando a citosina está metilada. Há muitos métodos para analisar estes produtos de PCR. Os mais comuns são o sequenciamento direto ou a hibridização com microarranjos que contém oligonucleotídios representando todas as permutações das alterações esperadas. Outro método comum é a PCR metilação-específica (MSP), em que o *primer* é elaborado para que possa apenas hibridizar e sofrer extensão se a citosina for metilada e, portanto, preservada durante o tratamento com bissulfito.

A expressão gênica e a transcriptômica

A transcriptômica representa o conteúdo de RNAs que é transcrito a partir do genoma

A transcrição de um gene origina em média 4-6 variantes de mRNA, que são traduzidos em diferentes proteínas. A maior parte do transcriptoma consiste em RNAs não codificadores que realizam importantes funções estruturais e regulatórias.

O transcriptoma é naturalmente mais dinâmico do que o genoma e pode variar amplamente entre diferentes tipos celulares, tecidos e condições distintas. **Os genes**

representam as sequências de DNA que correspondem a unidades funcionais distinguíveis de hereditariedade. Essa definição retrocede às experiências realizadas por Gregor Mendel, o pai da genética, na década de 1860, que demonstrou que a cor da planta da ervilha é herdada como unidades genéticas distintas. Cerca de 100 anos mais tarde, Marshall Nirenberg definiu uma relação simples, isto é, **"o gene faz RNA faz proteína",** que ancorou o conceito de que os genes codificam a informação para produzir proteínas e o RNA é o mensageiro que transporta essa informação (daí o nome mRNA). Tem-se verificado que cada etapa é altamente regulada e diversificada.

Os humanos possuem apenas cerca de 23.000 genes codificadores de proteínas, os quais originam em média 4-6 transcritos de mRNA, por meio de processos de splicing alternativo, edição de RNA e uso de promotores alternativos

A tradução destes mRNAs em proteínas (Cap. 34) é também um processo altamente regulado, pelo que não é possível fazer correlações gerais diretas entre a expressão de mRNA e a concentração de proteínas. **Os genes codificadores de proteínas apenas constituem 1-2% da sequência do genoma humano**, e a suposição de que a maioria dos transcritos tem origem nos genes tem sido recentemente suplantada pela descoberta de que mais de 80% do genoma pode ser transcrito. Enquanto alguns desses **RNAs não codificadores** têm funções estruturais, por exemplo, como parte dos ribossomos, a maioria regula a transcrição gênica, o processamento do mRNA, a estabilidade do mRNA e a tradução em proteínas (Quadro de Conceitos Avançados, acima). **Assim, a maior parte do transcriptoma parece ser dedicada a funções reguladoras**, e estes RNAs reguladores podem também ser resultantes da transcrição de segmentos de genes codificadores de proteínas. Desta forma, o conceito do que constitui um gene será provavelmente revisto nos próximos anos.

Quadro de conceitos avançados

RNAs não codificadores (ncRNAs)

RNAs não codificadores (ncRNAs) é uma abreviatura para RNAs que não codificam proteínas. Esse grupo inclui espécies abundantes, como **RNAs de transferência** e **RNAs ribossomais,** que estão envolvidos na tradução proteica. Vários ncRNAs funcionam como guias moleculares participantes em processos que requerem o reconhecimento específico de sequência, como o *splicing* de RNA ou a manutenção dos telômeros. Contudo, a grande maioria de ncRNAs parece ter funções reguladoras na expressão gênica. Essa concepção tornou-se divulgada com a atribuição do Prêmio Nobel a Andrew Fire e Craig Mello em 2006 *"pela sua descoberta da interferência do RNA — silenciamento gênico por RNA de cadeia dupla"*. Estes **pequenos RNAs de interferência** (**si,** de *small interfering*) fazem parte de um complexo enzimático que localiza e cliva mRNAs com elevada especificidade, conferida pela sequência do siRNA. Os siRNAs já se tornaram uma ferramenta poderosa no arsenal dos biologistas moleculares para inibir a expressão de mRNAs selecionados com elevada especificidade e eficiência.

MicroRNAs (miRNAs) são igualmente pequenos RNAs transcritos ou sob o controle de seu próprio promotor ou muitas vezes também como parte de íntrons em genes codificadores de proteínas. Derivam de transcritos mais longos e são mais extensamente processados do que os siRNAs. Funcionalmente, uma distinção importante é que os **siRNAs são muito específicos,** pelo que requerem uma correspondência perfeita dos seus alvos, enquanto **os miRNAs possuem um mecanismo de reconhecimento de sequência imperfeito,** e portanto atuam em um grande número de alvos, regulando frequentemente conjuntos inteiros de genes. Outra diferença é que os siRNAs induzem a degradação do mRNA, enquanto os miRNAs podem ainda impedir a tradução do mRNA. O genoma humano codifica >1.000 miRNAs, os quais podem regular até 60% dos genes, desempenhando desta forma um papel fundamental no controle da expressão gênica. Devido à sua ação pleiotrópica, os **miRNAs** podem afetar programas completos de expressão gênica, e a expressão aberrante de miRNA tem sido implicada em várias doenças humanas, incluindo o câncer, a obesidade e a doença cardiovascular.

A estrutura do gene e expressão gênica

Um gene consiste em regiões promotoras, éxons e íntrons. O promotor regula a transcrição, enquanto os éxons são os constituintes dos mRNAs

Os genes codificadores de proteínas tipicamente incluem uma região promotora, que contém o local de início da transcrição e participa no seu controle, no dos éxons e íntrons (Fig. 36.6). Os íntrons são removidos do transcrito primário pelo *splicing*, e o mRNA maduro apenas contém éxons. O papel dos íntrons não está bem definido, mas estes podem conter sequências reguladoras, incluindo promotores alternativos que podem modular a expressão gênica. O uso de **promotores alternativos** e ***splicing* alternativo** aumenta as variantes de proteínas que um gene pode codificar.

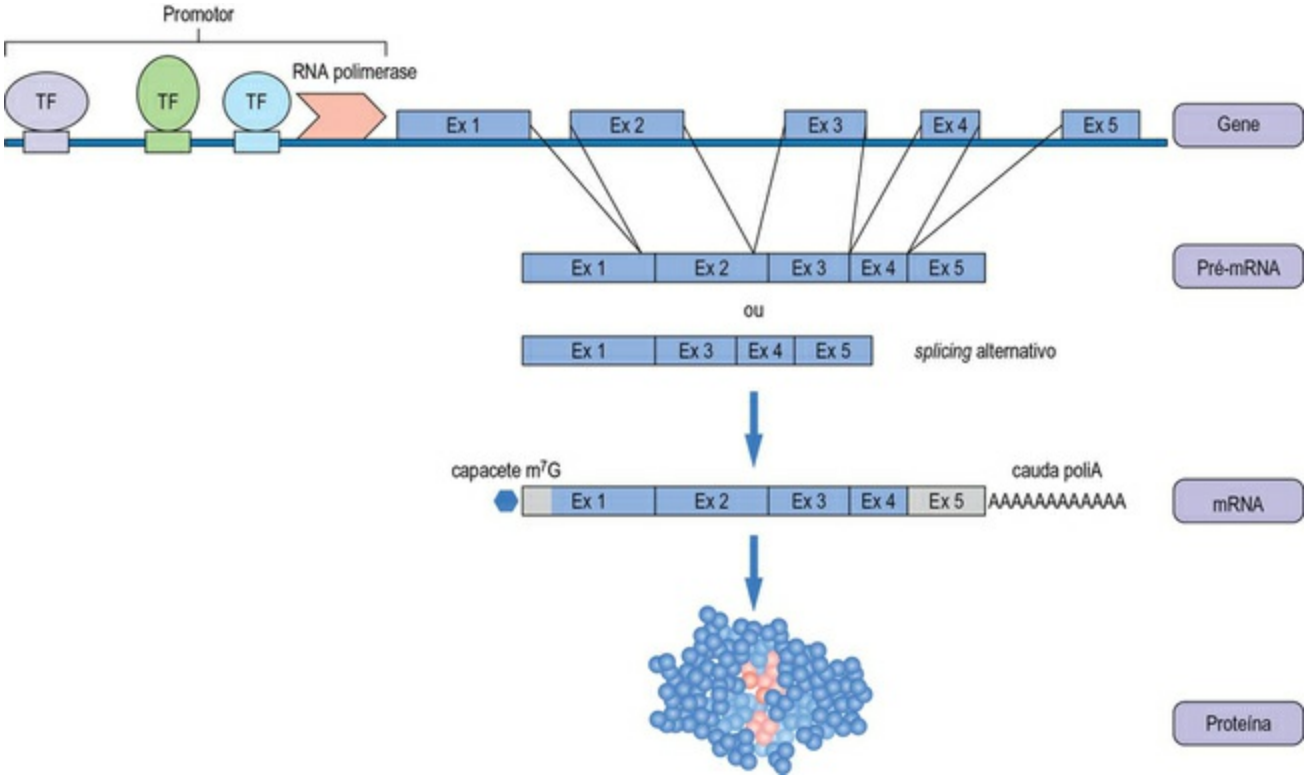


FIG. 36.6 Estrutura e transcrição de um gene codificador de proteína. Os genes codificadores de proteínas são organizados em éxons e íntrons. A transcrição gênica é controlada por fatores de transcrição (TFs), que se ligam a elementos da sequência específicos no promotor do gene e regulam a capacidade da RNA polimerase para transcrever, isto é, para copiar a sequência de DNA do gene para RNA. O RNA transcrito é processado em RNA mensageiro (mRNA) maduro pela remoção de íntrons, adição de uma cauda poliadenil na extremidade 3' e um capacete de 7-metilguanosina (m^7G) na extremidade 5', que medeia a ligação aos ribossomos e a tradução em proteínas. Os éxons não traduzidos e parte dos éxons estão ilustrados em cinzento. A maioria dos genes produz vários mRNAs resultantes do *splicing* alternativo em que diferentes éxons são incluídos.

Alguns genes produzem até 20 mRNAs distintos por meio de processos de splicing diferentes, com uma média estimada de ~5 transcritos por gene humano

A maturação adicional do mRNA envolve o acrescento de uma **cauda poliA na extremidade 3'** para a exportação nuclear, e a adição de um **capacete *(cap)* de 7-metilguanilato na extremidade 5'** necessário para a interação eficiente com o ribossomo. O mRNA maduro tipicamente contém outros elementos de controle nas regiões não traduzidas que regulam a ligação aos ribossomos e a eficiência da tradução. A tradução proteica é explicada no Capítulo 34. Assim, neste capítulo apenas são discutidos os princípios da regulação da transcrição.

Os **promotores gênicos** tipicamente têm dois elementos: (i) **um sítio de ligação para o complexo da RNA polimerase,** que lê a sequência genética de DNA e sintetiza a partir desta o RNA complementar; e (ii) um ou mais **sítios de ligação para fatores de transcrição** (TFs), que modulam a taxa de transcrição. Os TFs são proteínas modulares que consistem em domínios individualizáveis, de ligação ao DNA e de transativação, que regulam a atividade da transcrição da RNA polimerase (Cap. 35). Os domínios de ligação ao DNA reconhecem pequenas sequências de nucleotídios. De acordo com seus efeitos na transcrição, os TFs são classificados como **ativadores** ou **repressores**. Os TFs que

consistem apenas em domínios de ligação ao DNA atuam como repressores, uma vez que ocupam os sítios de ligação sem serem capazes de estimular a transcrição. Inversamente, os TFs que contêm apenas domínios de transativação atuam como correguladores que dependem da interação com outras proteínas de ligação ao DNA para regular a transcrição. Os sítios de ligação que conferem respostas a estímulos específicos ou hormônios são frequentemente chamados **elementos de resposta**, por exemplo, o elemento de resposta ao estrogênio (Cap. 35). Os ativadores e repressores estão muitas vezes localizados no promotor gênico, mas também em íntrons ou mesmo mais distalmente a montante ou a jusante de um gene, já que conseguem atuar a longas distâncias. Esses efeitos remotos são mediados pelo ainda mal compreendido arranjo tridimensional do DNA, que pode juntar espacialmente fatores ligados em locais distantes em uma molécula linear de DNA.

Os TFs podem afetar a transcrição diretamente ao controlarem a função da RNA polimerase, ou indiretamente ao afetar a estrutura da cromatina

A transcrição só pode prosseguir quando as histonas são acetiladas e a cromatina está na sua conformação aberta permissiva para a transcrição. Assim, **muitos TFs associam-se a enzimas modificadoras de histonas** que alteram a estrutura da cromatina para facilitar ou reprimir a transcrição. A função do TF em si é controlada por complexas **redes de transdução de sinal celulares** que processam os sinais externos, tais como a estimulação por fatores de crescimento, hormônios ou outros sinais extracelulares, em alterações na atividade do TF. Essas alterações são muitas vezes conferidas pela fosforilação, que pode regular a localização nuclear dos TFs, sua capacidade de ligação ao DNA, ou sua ação reguladora da atividade da RNA polimerase. A presença de diferentes sítios de ligação de TF em um promotor gênico contribui adicionalmente para a regulação combinatória. Como os **TFs representam mais de 10% de todos os genes humanos,** este tipo de controle multicamadas assegura que a transcrição gênica possa ser minuciosamente ajustada de uma maneira altamente versátil a estados celulares específicos e requisitos ambientais.

Estudo da transcrição gênica por (micro)arranjos gênicos e sequenciamento de RNA

Os métodos para o estudo da transcrição no global estão já estabelecidos atualmente. Os **(micro)arranjos gênicos** contêm vários milhões de locais (*spots*) para o DNA, organizados em uma lâmina com uma ordem definida (Fig. 36.7). Os arranjos modernos usam oligonucleotídios sintéticos, os quais podem ser pré-fabricados e depositados no *chip* ou sintetizados diretamente na superfície do *chip*. Geralmente são usados vários oligonucleotídios por gene. Estes oligonucleotídios são cuidadosamente concebidos com base na informação dada pela sequência do genoma de modo que representem sequências únicas adequadas para a identificação inequívoca de transcritos de RNA específicos. Os atuais arranjos de elevada densidade contêm pontos de dados suficientes para avaliar a transcrição de todos os genes humanos, para mapear o conteúdo de éxons e das variantes do *splicing* de mRNAs. Os RNAs não codificadores, como siRNAs e

miRNAs também podem ser incluídos. **Os arranjos são hibridizados com sondas de RNA complementar (cRNA)** correspondendo aos transcritos de RNA isolados de células e tecidos que se pretendam comparar. As sondas são elaboradas a partir de RNAs isolados que são copiados inicialmente para cDNA pela transcriptase reversa, uma polimerase que usa o RNA como molde para sintetizar o DNA. O DNA complementar (cDNA) resultante é transcrito novamente em cRNA, uma vez que o RNA hibridiza mais intensamente com os oligonucleotídios de DNA do arranjo comparativamente ao cDNA. Durante a síntese de cRNA, são incorporados nucleotídios modificados marcados com corantes ou marcadores fluorescentes, como a biotina, que podem ser facilmente detectados após hibridização da sonda de cRNA no arranjo. Após a hibridização e a remoção das sondas não ligadas, o arranjo é examinado e as intensidades de hibridização são comparadas usando análise estatística e bioinformática. Os resultados permitem uma quantificação relativa da diferença na abundância de transcritos entre as duas amostras ou em diferentes períodos de tempo. Devido a uma convenção comum para reportar as experiências com microarranjos, denominada informação mínima para a anotação de experiências de microarranjos (MIAME, de *Minimal Information for the Annotation of Microarray Experiments*), os resultados dos arranjos de diferentes experiências podem ser comparados, e a existência de bases de dados públicas de arranjos gênicos é uma fonte valiosa para análises adicionais. A análise de arranjos gênicos já deverá ser utilizada para aplicações clínicas. Por exemplo, os padrões de transcrição gênica nos **cânceres de mama** têm sido aplicados em testes para avaliar o risco de recorrência e o potencial benefício da quimioterapia.

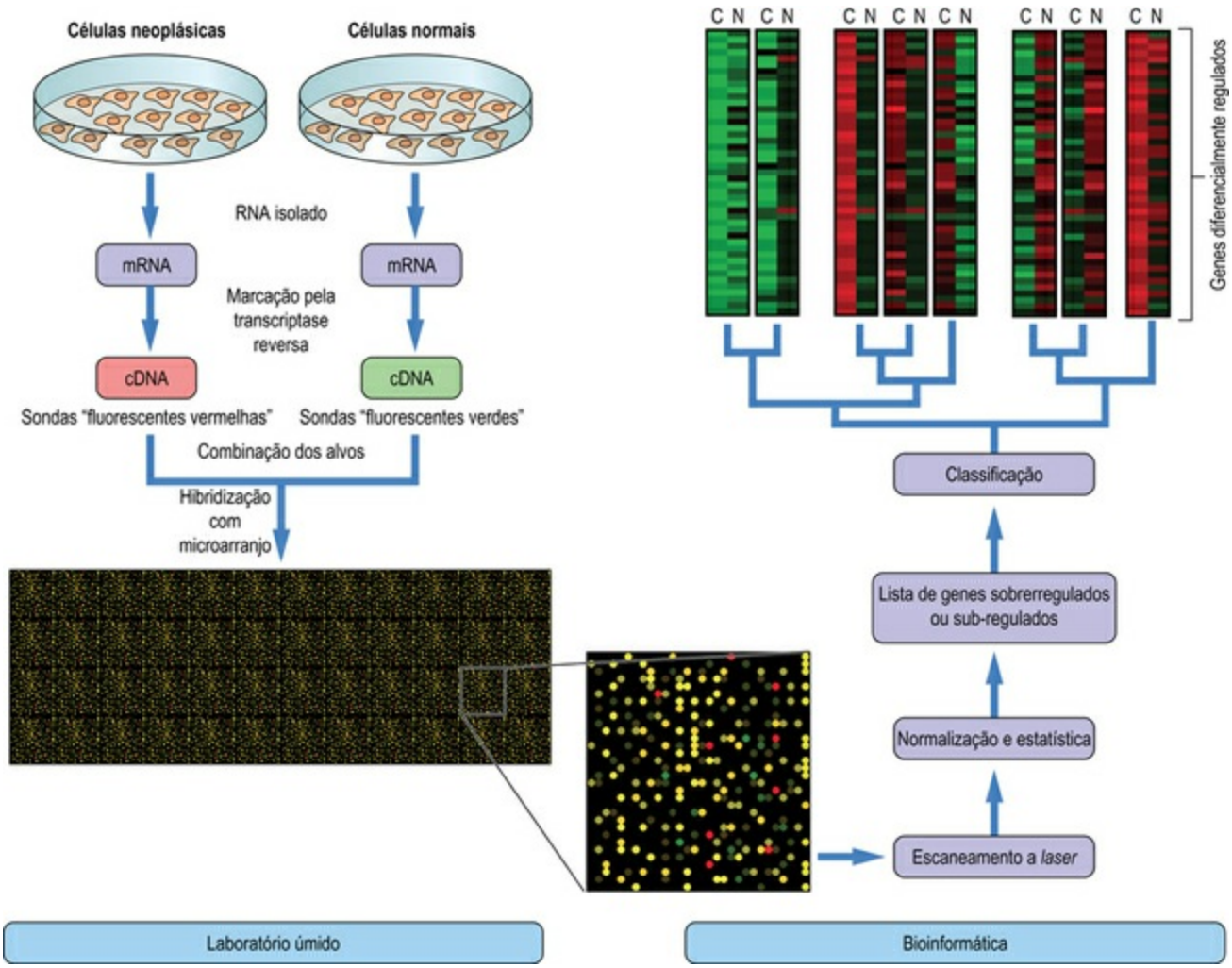


FIG. 36.7 O fluxo de trabalho de uma experiência com (micro)arranjo gênico. Uma experiência de microarranjo em duas cores comparando células normais e neoplásicas é mostrada como exemplo. Ver o texto para mais detalhes. Uma forma comum de exibir os resultados é a utilização de mapas de calor, nos quais intensidades crescentes de vermelhos e verdes indicam genes sobrerregulados ou sub-regulados, respectivamente, enquanto o preto significa que não há alteração. C, células neoplásicas; N, células normais. A figura foi modificada de http://en.wikipedia.org/wiki/DNA_microarray.

A análise do transcriptoma também pode ser realizada por **sequenciamento direto,** após a conversão dos RNAs em cDNAs. Os avanços em métodos de sequenciamento de DNA rápidos e baratos permitem que cada transcrito seja sequenciado múltiplas vezes. Estes **métodos de "sequenciamento profundo"** não só identificam inequivocamente os transcritos e variantes do *splicing*, mas também permitem a quantificação direta dos transcritos sobre toda uma gama dinâmica de expressão de RNA, resultando na obtenção de números absolutos de transcritos em vez de comparações relativas. Assim, os métodos de sequenciamento, denominados **RNA seq,** estão rapidamente se tornando alternativas atrativas frente aos métodos de transcriptômica com base em microarranjos.

A técnica ChIP-on-chip combina a imunoprecipitação de cromatina com a tecnologia de microarranjo

O mapeamento da ocupação dos sítios de ligação dos fatores de transcrição pode revelar quais são os genes suscetíveis de serem regulados por esses fatores

A nossa capacidade para inspecionar a transcrição de todos os genes humanos conhecidos levanta a questão acerca de quais os TFs que estão a controlar os padrões de transcrição observados. O genoma humano contém muitos milhares de sítios de ligação para qualquer fator de transcrição, mas apenas uma pequena fração destes sítios de ligação se encontra efetivamente ocupada pelos TFs e está envolvida na regulação da transcrição gênica. Assim, **o mapeamento sistemático da ocupação dos sítios de ligação dos TFs pode revelar quais são os genes efetivamente regulados por determinados TFs.** As técnicas desenvolvidas para tal (Fig. 36.8) combinam a **imunoprecipitação de cromatina (ChIP)** com a **tecnologia de microarranjo *(chip)*** ou com o sequenciamento do DNA, e são denominadas **ChIP-on-chip ou ChIP-seq.**

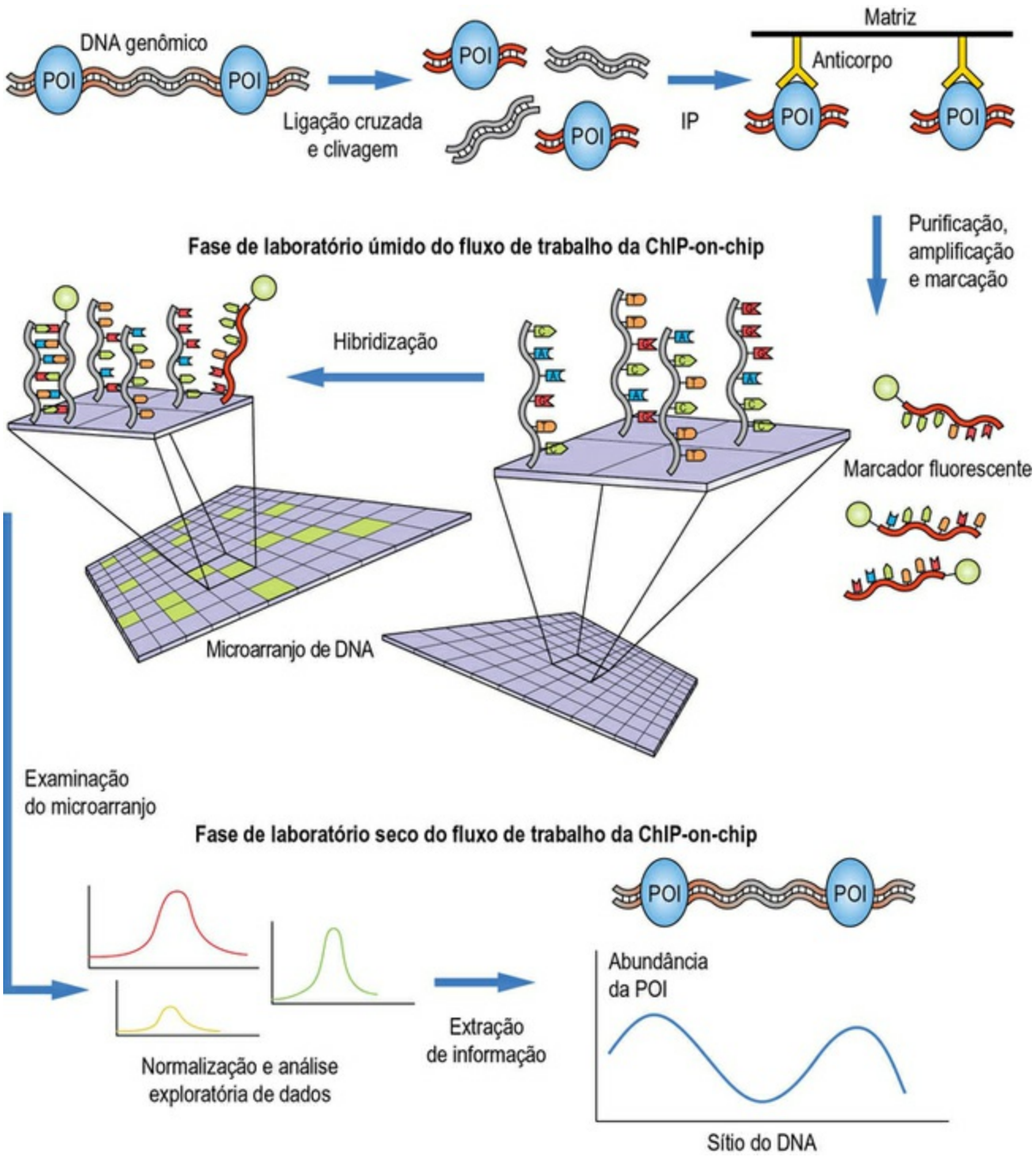


FIG. 36.8 Análise ChIP-on-chip. Ver texto para mais detalhes. POI, proteína de interesse. A figura foi modificada de http://en.wikipedia.org/wiki/Image:ChIP-on-chip_wet-lab.png.

A ChIP envolve a formação de ligações cruzadas covalentes entre as proteínas e o DNA ao qual se encontram ligadas por meio do tratamento de células vivas com formaldeído. Depois o DNA é purificado e dividido em pequenos fragmentos (0,2-1 kb) por sonicação de ultrassom. Estes fragmentos de DNA podem ser isolados ao imunoprecipitar a proteína que apresenta ligação cruzada utilizando um anticorpo específico. O DNA associado é então eluído e identificado por PCR com *primers* específicos que amplificam a região do DNA que se pretende examinar. Esse método avalia um sítio de ligação de cada vez e requer uma hipótese que sugira que sítio(s) deve(m) ser examinado(s). Contudo, a identificação do DNA associado pode ser sujeita à multiplexação maciça com o uso de microarranjos de DNA para detecção que sejam representativos de todo ou de grande

parte do genoma. Similarmente, tal como discutido acima, como alternativa aos microarranjos gênicos, o DNA associado pode ser identificado por sequenciamento.

As técnicas ChIP-on-chip e ChIP-seq são poderosas e informativas e permitem correlacionar a ligação do TF com a atividade da transcrição. **As técnicas ChIP podem ser usadas para estudar qualquer proteína que interaja com o DNA,** incluindo proteínas envolvidas na replicação do DNA, na reparação do DNA e na modificação da cromatina. O sucesso da técnica é extremamente dependente da qualidade e especificidade dos anticorpos usados, já que as quantidades de DNA coimunoprecipitado são muito pequenas, e não existe outra etapa de separação além da especificidade fornecida pelo anticorpo.

Proteômica

A proteômica é o estudo do conteúdo proteico da célula; o equivalente proteico do transcriptoma e do genoma

A palavra "proteoma" foi criada por Marc Wilkins em uma conversa em Siena em 1994. Wilkins definiu o proteoma como o conteúdo proteico da célula, o equivalente proteico do transcriptoma e do genoma. Desde então o estudo do proteoma, denominado proteômica, expandiu-se em uma variedade de temas diferentes abrangendo muitas áreas da ciência de proteínas.

A proteômica é possivelmente a mais complexa de todas as ciências -ômicas, mas também é provavelmente a mais informativa, já que as proteínas são as entidades funcionais da célula, e praticamente não há nenhum processo biológico que ocorra sem a intervenção de uma proteína. Entre os seus muitos papéis, as proteínas são responsáveis pela organização estrutural de uma célula, uma vez que compõem o citoesqueleto, pelo controle do transporte de membrana (Cap. 8) e pela produção de energia. Portanto, a compreensão do proteoma será necessária para entender o funcionamento da biologia.

Inicialmente, a proteômica concentrava-se em catalogar as proteínas contidas em uma organela, célula, tecido ou organismo, no processo de validação da existência dos genes previstos no genoma. Este cenário rapidamente evoluiu para a proteômica comparativa, na qual os perfis proteicos de duas ou mais amostras eram comparados para identificar diferenças quantitativas que poderiam ser responsáveis pelo fenótipo observado: por exemplo, entre células doentes e células saudáveis, ou averiguar alterações induzidas por tratamentos farmacológicos. Atualmente, a proteômica também inclui o **estudo das modificações pós-traducionais** de proteínas individuais, a composição e a dinâmica dos **complexos proteicos,** o mapeamento de redes de **interações entre proteínas** e a identificação de **biomarcadores de doença.** A proteômica quantitativa tornou-se uma ferramenta robusta, e mesmo a quantificação absoluta é relativamente rotineira.

A proteômica apresenta diversos desafios

Rapidamente se tornou aparente que a complexidade do proteoma seria um grande obstáculo para alcançar a idealização inicial de Wilkins de observar todas as proteínas em

uma célula ou organismo ao mesmo tempo.

Enquanto o número de genes em um organismo não é esmagador, a existência de modificações pós-traducionais (PTM) das proteínas em sistemas eucarióticos, tal como o *splicing* alternativo e a potencial adição de mais de 40 grupos químicos diferentes por ligação covalente (incluindo os conhecidos exemplos de fosforilação e glicosilação), significa que pode haver 10 ou, em casos extremos, 1.000 espécies diferentes de proteínas, todas muito similares, geradas a partir de cada gene, e que os presumidos 23.000 genes do genoma humano poderiam originar 500.000 ou mais espécies de proteínas individuais na célula. Além disso, existe uma grande variedade de abundâncias de proteínas na célula, que se estima variar entre menos de 10 até 500.000 ou mais moléculas por célula, e a função de uma proteína pode depender da sua abundância, de PTMs, da localização na célula e da associação a outras proteínas, e todos estes fatores podem mudar em frações de segundo!



Quadro de conceitos avançados

Modificações pós-traducionais

Durante o processo de transcrição, tradução e funcionamento da célula, as proteínas podem sofrer uma série de modificações. Durante a transcrição, os íntrons são retirados do gene por *splicing*, e diferentes tipos de *splicing* do gene podem resultar na produção de uma variedade de mRNAs diferentes; portanto, uma quantidade de proteínas que diferem marcadamente em sua sequência podem surgir do mesmo gene. Após a tradução do mRNA em proteína, esta pode ser "decorada" com uma gama desconcertante de grupos químicos adicionais ligados covalentemente, muitos dos quais regulam a atividade da proteína. Alguns exemplos são dados a seguir:

- **A adição de ácidos graxos** aos resíduos de cisteína, que ancoram a proteína à membrana.
- **Glicosilação:** a adição de oligossacarídios complexos a um resíduo de asparagina ou serina, comum em proteínas de membrana que possuem um componente extracelular ou são secretadas. Muitas proteínas envolvidas nos eventos de reconhecimento célula-célula são glicosiladas, assim como os anticorpos.
- **Fosforilação:** adição de um grupo fosfato a resíduos de serina, treonina, tirosina ou histidina. Essa é uma modificação que pode ser adicionada ou removida, permitindo que um sistema responda muito rapidamente a uma alteração do ambiente. É fundamental para os eventos de sinalização celular. Foi estimado que um terço de todas as proteínas eucarióticas pode sofrer fosforilação reversível.
- **Ubiquitinação:** adição de uma cadeia de poliubiquitina que marca uma proteína para destruição por um proteassoma. A ubiquitinação também pode regular as atividades enzimáticas e a localização subcelular. A ubiquitina é ela própria uma proteína pequena.
- **Formação de pontes de dissulfeto** entre resíduos de cisteína da cadeia principal

polipeptídica que se aproximam espacialmente após o dobramento da proteína. Estas desempenham diversas funções, incluindo fornecer estabilidade estrutural adicional, especialmente para proteínas exportadas, e percepcionar o equilíbrio redox na célula.

- **Acetilação** de resíduos, mais frequentemente o *N*-terminal da proteína ou a lisina. A acetilação da lisina nas histonas desempenha um papel importante no processo de transcrição gênica, e os fármacos que têm como alvo as proteínas que acetilam ou desacetilam as histonas são terapêuticas potenciais para o câncer.
- **Clivagem proteica:** a maioria das proteínas tem a metionina *N*-terminal removida que resulta do códon de iniciação ATG da tradução gênica. Em algumas proteínas ocorre a clivagem da cadeia polipeptídica, tal como na ativação dos zimogênios na cascata de coagulação, ou então partes significativas da cadeia polipeptídica inicial são removidas completamente, por exemplo, na conversão da pró-insulina em insulina.

Não há um equivalente proteico da PCR que permita a amplificação das sequências proteicas, por isso estamos limitados à quantidade de proteína que pode ser isolada da amostra

Se a amostra for pequena, por exemplo, uma biopsia por agulha, um tipo celular raro ou um complexo de sinalização isolado, então são necessários métodos ultrassensíveis para detectar e analisar as proteínas.

É evidente que a proteômica é um compromisso extremamente desafiante. Foi somente após a introdução de novos métodos de **espectrometria de massa** em meados dos anos 1990 que puderam ser feitas tentativas para analisar o proteoma, e métodos novos de alto rendimento e de alto conteúdo de dados estão continuamente sendo desenvolvidos. Os proteomas de espécies procariotas, por exemplo, *Mycoplasma*, ou eucariotos simples, por exemplo, leveduras, têm sido decifrados em termos de identificação das proteínas expressas e de muitas das suas interações. Inclusivamente o conteúdo de proteínas humanas expressas em linhas celulares tem sido determinado, mas ainda estamos muito longe de sermos capazes de identificar todas as variantes de proteínas e PTMs.

A proteômica na medicina

Apesar dos desafios, a proteômica é uma ferramenta essencial na compreensão dos processos biológicos fundamentais e está completamente estabelecida

Tal como a tecnologia das outras -ômicas, ela tem a vantagem de possibilitar descobrir novas informações sobre um problema biológico sem a necessidade prévia de um entendimento claro daquilo que pode estar alterado. Frequentemente são gerados mais dados por uma boa experiência de proteômica do que aqueles aos quais é razoável, ou possível, dar seguimento.

A proteômica tem sido aplicada com sucesso ao estudo de alterações bioquímicas básicas em muitos tipos diferentes de amostras biológicas: células, tecidos, plasma,

urina, fluido cerebroespinal (CSF) e até mesmo no fluido intersticial colhido por microdiálise

Em células isoladas de culturas celulares, é possível fazer perguntas biológicas fundamentais complexas. Uma área amplamente estudada é a decifração das cascatas de sinalização mitogênicas, que envolvem a associação específica de proteínas em complexos multiproteicos, e a compreensão de como estas podem estar alteradas no câncer. É possível obter informações a partir dos fluidos biológicos sobre o estado geral de um organismo porque, por exemplo, o sangue está em contato com todas as partes do corpo. Doenças em localizações específicas podem possivelmente evidenciar-se sob a forma de alterações no conteúdo proteico do sangue, à medida que ocorre extravasamento do tecido lesado. Atualmente, esta área é com frequência descrita como **descoberta de biomarcadores.** Os tecidos são um desafio maior. A heterogeneidade de muitos tecidos torna difícil comparar biopsias teciduais que podem conter quantidades diferentes de tecido conjuntivo, vasculatura etc. Incrementos na sensibilidade da análise estão superando esse problema, permitindo que pequenas quantidades de material obtido por métodos de separação tecidual, como a captura e microdissecção a *laser* ou a citometria de fluxo, sejam usadas para análise. Existe um grande empenho a ser direcionado para o desafio final: analisar células individualmente. Isso tem valor, pois as abordagens atuais fazem a média das alterações na amostra analisada, e com isso perde-se toda a informação da heterogeneidade natural na biologia: por exemplo, uma alteração registrada de 50% nos níveis de uma proteína pode corresponder a uma alteração de 50% em todas as células, ou de 100% em 50% das células da amostra.

Principais métodos usados na proteômica

A proteômica está dependente da separação de misturas complexas de proteínas ou peptídios, da quantificação das abundâncias proteicas e da identificação das proteínas

Esta abordagem tem múltiplas etapas, mas é modular, o que se reflete nas muitas combinações de separação, quantificação e identificação. Agora o objetivo é o de realçar os princípios em vez de se tentar pormenorizar.

Técnicas de separação de proteínas

As estratégias para a separação de proteínas são motivadas pela necessidade de reduzir a complexidade, ou seja, o número de proteínas a serem analisadas, enquanto se retém o máximo de informação possível do contexto funcional da proteína, incluindo sua localização subcelular, sua incorporação em diferentes complexos proteicos e a grande variedade de PTMs. Nenhum método concilia todos estes requisitos. Assim, diferentes métodos foram desenvolvidos, os quais tiram partido da variedade de propriedades físico-químicas das proteínas (tamanho, carga, hidrofobicidade, PTMs, etc.) para separar misturas complexas (Fig. 36.9).

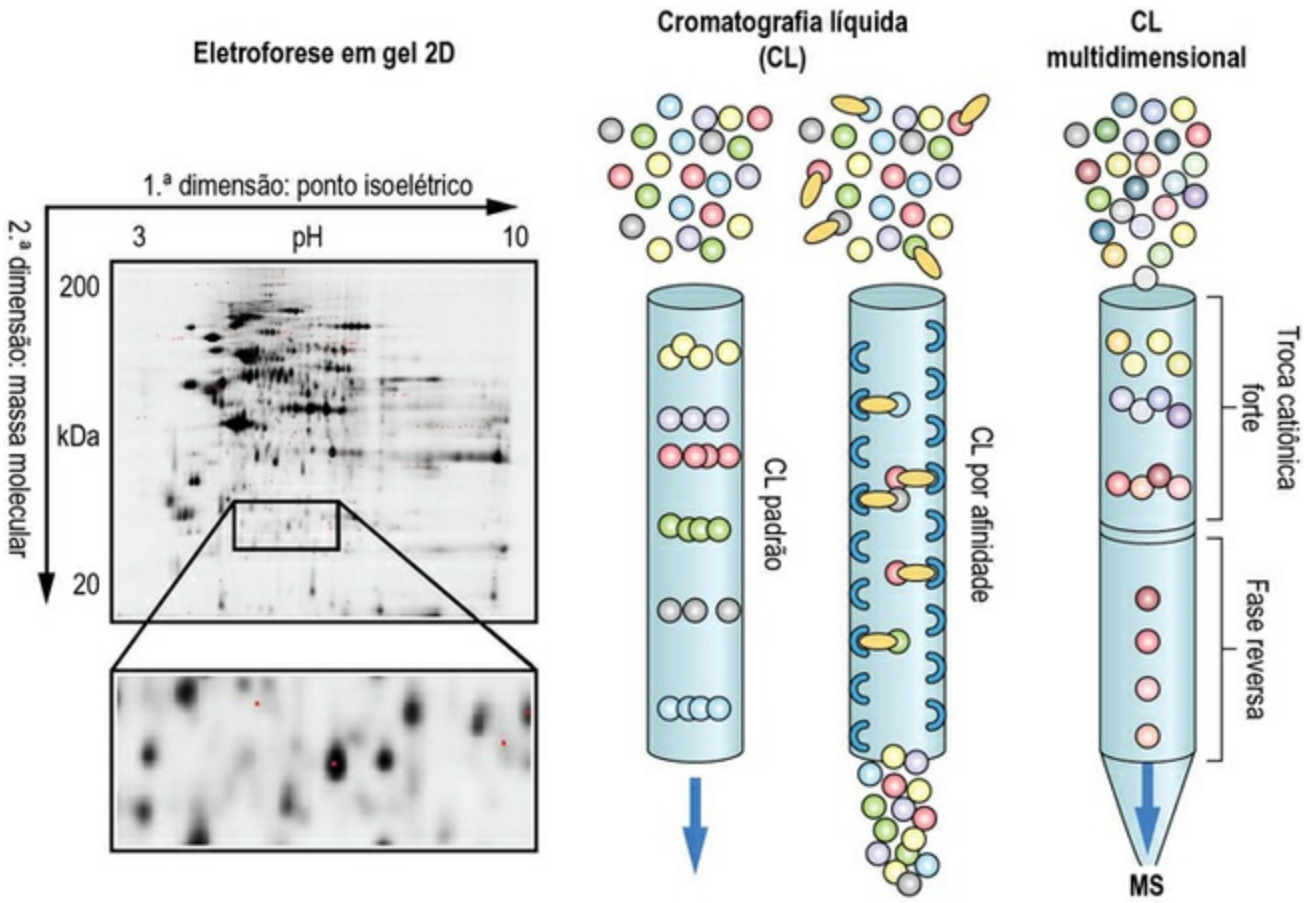


FIG. 36.9 Técnicas de separação de proteínas e peptídios. O **painel esquerdo** mostra um gel 2D, em que os lisados proteicos foram separados por focalização isoelétrica na primeira dimensão, e de acordo com a massa molecular na segunda dimensão. As manchas de proteínas *(spots)* foram visualizadas por coloração fluorescente. O **painel intermédio** ilustra os princípios da CL, em que as proteínas e peptídios são separados por diferentes interações físico-químicas com a resina, à medida que o fluxo percorre a coluna. Uma variação é a CL por afinidade, na qual a resina é modificada com um grupo de afinidade que retém as moléculas que se ligam seletivamente a este grupo. O **painel da direita** demonstra a configuração da CL multidimensional, em que uma coluna de troca catiônica forte é acoplada diretamente a uma coluna de fase reversa, permitindo uma separação em 2 passos, por hidrofilicidade e hidrofobicidade. O eluído pode ser introduzido diretamente no espectrômetro de massa (MS) para a identificação do peptídio.

Um método clássico de separação de proteínas é a eletroforese em gel de poliacrilamida bidimensional (2DE, 2D-PAGE)

As proteínas são separadas por focalização isoelétrica de acordo com sua carga elétrica na primeira dimensão, e de acordo com seu tamanho na segunda dimensão. A marcação das proteínas com corantes fluorescentes ou com o uso de colorações fluorescentes tornou o método quantitativo, mas as manchas *(spots)* de proteínas têm de ser retiradas dos géis individualmente para a identificação subsequente por espectrometria de massa (MS).

Assim, a 2D-PAGE é atualmente muito menos usada e foi substituída pela **cromatografia líquida** (CL), que pode ser acoplada diretamente à **espectrometria de massa** (MS). Desta forma, as moléculas eluídas da coluna de cromatografia podem ser medidas e identificadas em tempo real. Por razões técnicas, a identificação com base na MS tem um melhor desempenho com moléculas menores, pelo que as proteínas são digeridas com proteases (geralmente tripsina) em pequenos peptídios antes da análise

por MS. A CL separa proteínas ou peptídios atendendo às suas diferentes propriedades físico-químicas, mais frequentemente a carga da molécula ou sua hidrofobicidade, usando a cromatografia de troca iônica ou de fase reversa, respectivamente. Isso é alcançado pela existência de grupos químicos ligados a uma resina particulada empacotada em uma coluna, a qual vai ser percorrida pela solução. As moléculas vão-se ligar à resina (fase estacionária) com diferentes afinidades. Aquelas com uma alta afinidade vão demorar mais a atravessar o comprimento da coluna e, portanto, vão eluir da coluna após um período de tempo maior. As moléculas são então separadas ao longo do tempo no efluente que sai da coluna. A cromatografia por afinidade usa resinas especializadas que se ligam fortemente a determinados grupos químicos ou epítopos biológicos e retêm as proteínas que transportam estes grupos. Por exemplo, as resinas que contêm Fe^{3+} quelatado ou TiO_2 (**cromatografia de afinidade com metal imobilizado** [IMAC]) ligam-se ao fosfato e são usadas para selecionar peptídios fosforilados. A CL também pode ser realizada em duas dimensões. Adicionando uma etapa de **cromatografia de troca catiônica forte (SCX)** antes da IMAC, removem-se muitos peptídios não fosforilados, e isto vai potenciar o enriquecimento em fosfopeptídios na etapa de IMAC.

O primeiro método de CL 2D com acoplamento direto das duas dimensões denomina-se tecnologia de identificação de proteínas multidimensional (MudPIT)

Na MudPIT o conteúdo proteico total da amostra é inicialmente digerido pela tripsina, e os peptídios resultantes são fracionados por uma coluna SCX, que separa os peptídios de acordo com a carga. Posteriormente, as frações de peptídios são adicionalmente separadas por CL de fase reversa e aplicadas diretamente na MS. Instrumentos de MS modernos de examinação rápida e de alta resolução acoplados à CL de separação de alta resolução tornam agora possível dispensar a primeira dimensão para todas as amostras, exceto as mais complexas. Este método de identificação de proteínas com base em peptídios, possibilitado pela MS, é muitas vezes referido como **"proteômica *shotgun*".**

Identificação de proteínas por espectrometria de massa (MS)

A espectrometria de massa é uma técnica usada para determinar as massas moleculares de moléculas em uma amostra

A MS pode também ser usada para selecionar um componente individual de uma mistura, quebrar sua estrutura química e medir as massas dos fragmentos, o que pode então ser usado para determinar a estrutura da molécula. Existem muitos tipos diferentes de espectrômetros de massa disponíveis, mas os princípios subjacentes da espectrometria de massa são relativamente simples. O primeiro passo no processo é gerar moléculas carregadas, íons, a partir das moléculas presentes na amostra. Isto é relativamente fácil de alcançar para muitas biomoléculas solúveis, porque a sua química polar providencia grupos que são facilmente carregados. Por exemplo, a adição de um próton (H^+) aos grupos da cadeia lateral dos aminoácidos básicos lisina, arginina ou histidina gera uma molécula carregada positivamente. Quando uma molécula carregada

é submetida a um campo elétrico, esta vai ser repelida pelo eletrodo de sinal idêntico e atraída pelo eletrodo de sinal oposto, acelerando a molécula em direção ao eletrodo de carga oposta. Uma vez que a força é igual para todas as moléculas, moléculas maiores vão acelerar menos do que as moléculas pequenas (força = massa × aceleração), portanto moléculas pequenas vão adquirir uma velocidade maior. Isto é utilizado para determinar a massa. Por exemplo, após as moléculas terem sofrido aceleração, o tempo necessário para atingirem certa distância pode ser medido e relacionado com a sua massa. Este processo é denominado **espectrometria de massa por tempo de voo** (*time-of-flight*).

Um espectrômetro de massa em tandem é efetivamente composto por dois analisadores de espectrometria de massa unidos sequencialmente, com uma área entre eles onde as moléculas podem ser fragmentadas

O primeiro analisador é usado para selecionar uma das moléculas de uma mistura com base em sua massa molecular, que é depois clivada em fragmentos menores, geralmente por colisão com uma pequena quantidade de gás na região intermédia (denominada célula de colisão). Os fragmentos gerados são então analisados no segundo espectrômetro de massa (Fig. 36.10). Como os peptídios tendem a se fragmentar na ligação peptídica, os picos de fragmentos resultantes são separados pela massa dos diferentes aminoácidos da sequência correspondente. Este resultado é, em teoria, semelhante ao método de Sanger para o sequenciamento de DNA, permitindo que a sequência peptídica seja deduzida. Contudo, em contraposição ao método de sequenciamento de DNA de Sanger, a fragmentação peptídica não é uniforme e, geralmente, o espectro apenas cobre parte da sequência, deixando lacunas e reconstruções da sequência ambíguas. Assim, **a sequência peptídica é deduzida com base na correspondência estatística das massas observadas em comparação com processos virtuais de digestão e fragmentação peptídica de proteínas em uma base de dados** (Fig. 36.11). Com a elevada precisão da MS e as bem documentadas bases de dados atuais, essas previsões computacionais das sequências são muito fiáveis. Isso também demonstra que a proteômica está intimamente dependente da qualidade e plenitude do sequenciamento do genoma, e que as bases de dados do genoma são usadas para inferir acerca das proteínas codificadas.

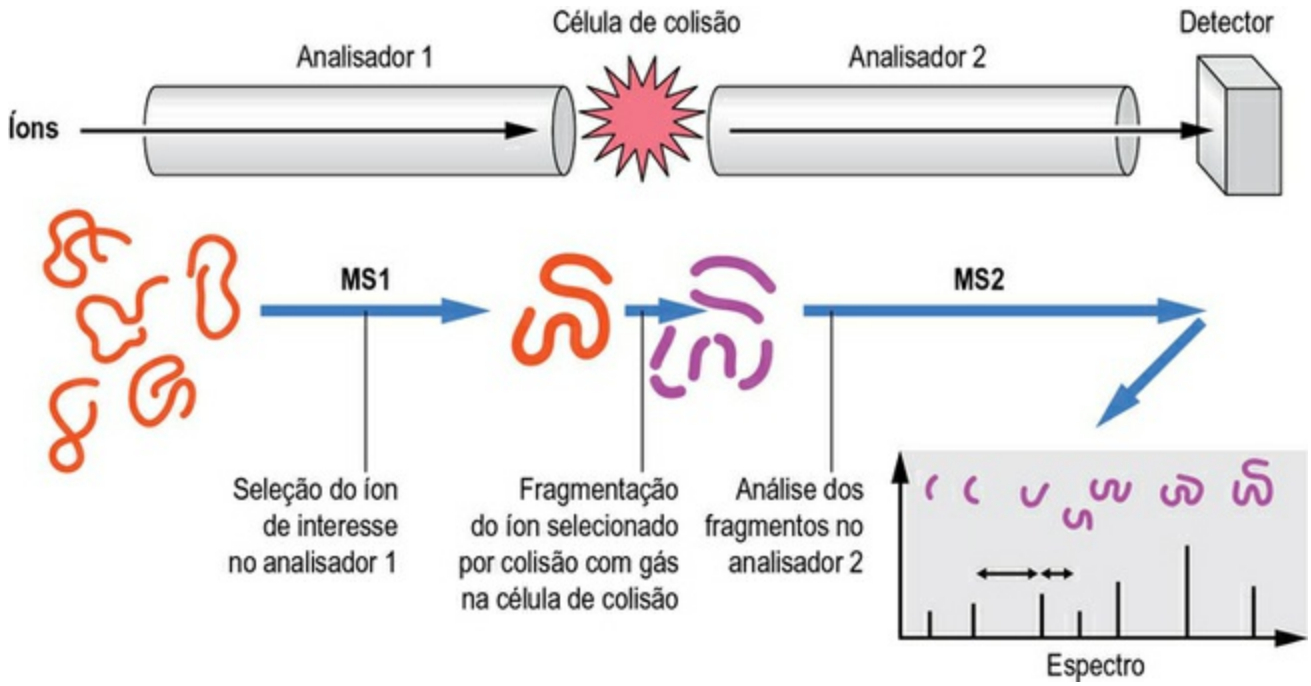


FIG. 36.10 Princípios básicos da espectrometria de massa em *tandem*. Ver texto para mais detalhes. MS, espectrômetro de massa.

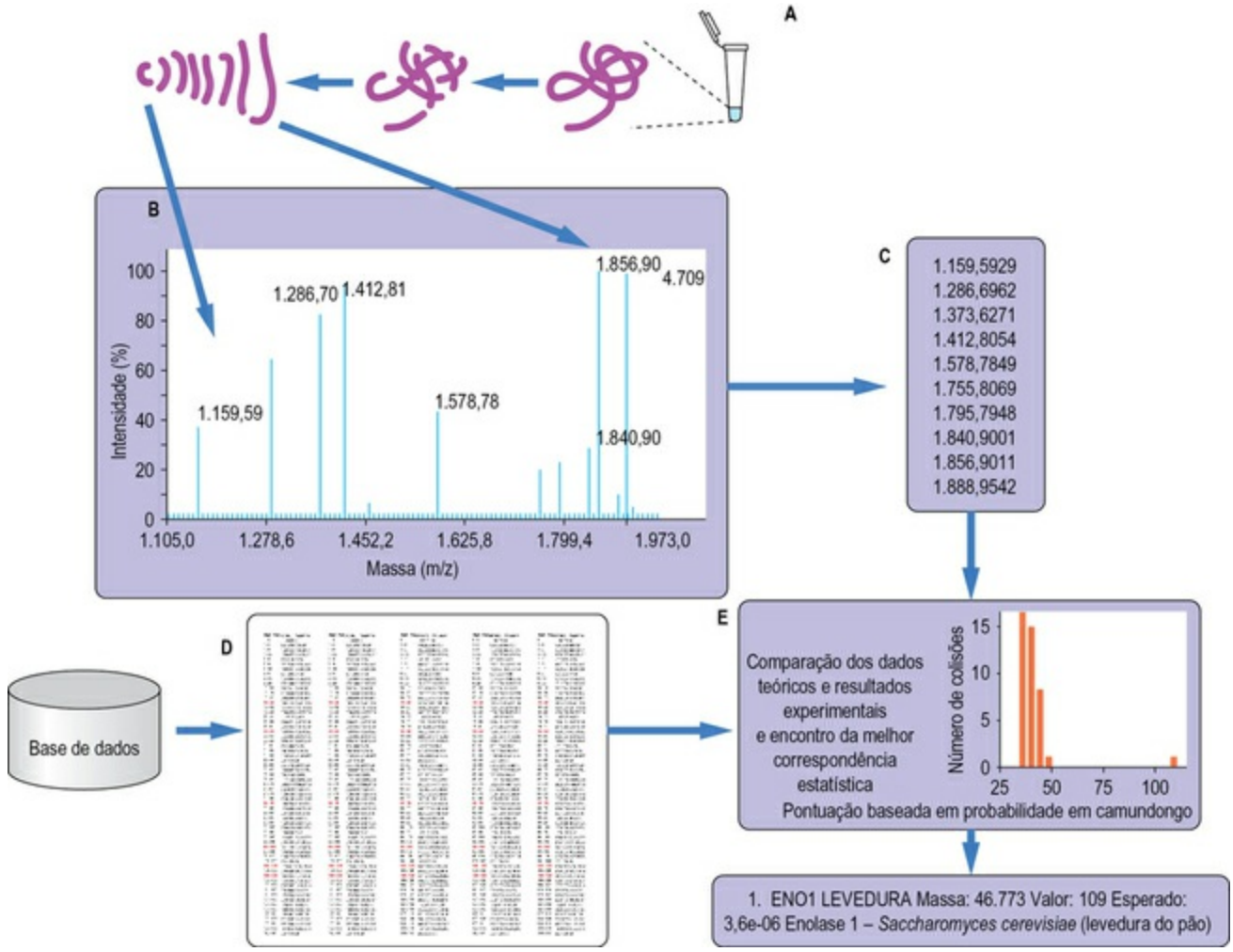


FIG. 36.11 Identificação de proteínas por espectrometria de massa. Um fluxo de trabalho típico: **(A)** a amostra é digerida com uma protease específica, geralmente a tripsina, para gerar um conjunto de peptídios menores, que serão exclusivos da proteína; **(B)** a massa de um subconjunto dos peptídios resultantes é medida usando a MS; na MS em *tandem* cada peptídio é fragmentado e a massa dos fragmentos é medida também; **(C)** uma lista das massas observadas experimentalmente é gerada a partir do espectro das massas; **(D)** uma base de dados de sequências proteicas é teoricamente digerida (e fragmentada no caso da MS) *in silico*, e um conjunto de tabelas dos peptídios esperados é concebida; **(E)** os dados experimentais são comparados com a base de dados teoricamente digerida e um valor estatístico da adequação dos dados experimentais aos dados teóricos é gerado, fornecendo um valor de "confiança", que indica a probabilidade de identificação correta.

A MS faz a medição e fragmenta os peptídios à medida que estes são eluídos da CL, o que resulta em proteínas abundantes a serem identificadas múltiplas vezes, enquanto proteínas pouco abundantes são negligenciadas se a MS estiver sobrecarregada por um fluxo abundante de peptídios. Essa é a principal razão por que o pré-fracionamento de proteínas e peptídios aumenta o número de proteínas identificadas com sucesso. Este fluxo de trabalho requer a medição de todo o conteúdo proteico, mesmo quando o interesse recai apenas em algumas proteínas específicas.

Para permitir a identificação dirigida de proteínas específicas foi desenvolvida uma técnica, denominada monitoramento de reação selecionada (SRM) ou monitoramento de reações múltiplas (MRM)

Este método usa a MS1 para selecionar um íon peptídico de uma mistura e depois o fragmenta e seleciona massas de fragmentos definidas para detecção na MS2 (Fig. 36.12).

O protocolo de um programa informático para a seleção peptídica da MS1 e para a detecção de fragmentos da MS2 proporciona identificações de proteínas únicas com base na medição de alguns peptídios selecionados. Este é um método preponderante para simplificar a identificação de proteínas de amostras complexas pela monitorização sistemática apenas dos fragmentos peptídicos mais informativos. O atlas peptídico (www.peptideatlas.org/) é uma base de dados desses fragmentos informativos, e irá facilitar bastante a análise sistemática dos proteomas e subproteomas.

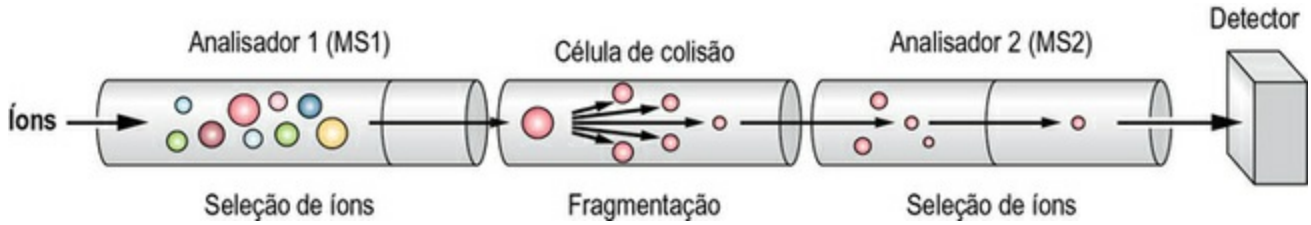


FIG. 36.12 Os princípios das experiências de monitorização de reação selecionada (SRM) ou monitorização de reações múltiplas (MRM). Ver o texto para mais detalhes.

Espectrometria de massa quantitativa

A MS pode se tornar quantitativa de várias maneiras. Se possível, as amostras podem ser cultivadas em um meio seletivo que providencia um aminoácido essencial na sua forma natural (a forma "leve") ou marcado isotopicamente com um isótopo estável (p. ex., ^{13}C ou ^{2}H, a forma "pesada"), o que faz com que todos os peptídios que contêm esse aminoácido apareçam mais pesados no espectrômetro de massa. Esse método é denominado **marcação com isótopos estáveis de aminoácidos em cultura de células** (SILAC, do inglês *stable isotope labeling with amino acids in cell culture*), e é um dos mais usados e consistentes da tecnologia de marcação (Fig. 36.13). As amostras são misturadas e analisadas usando a abordagem *shotgun*. As razões entre os peptídios "pesados" e os equivalentes peptídios "leves" são usadas para determinar as quantidades relativas da proteína da qual derivaram.

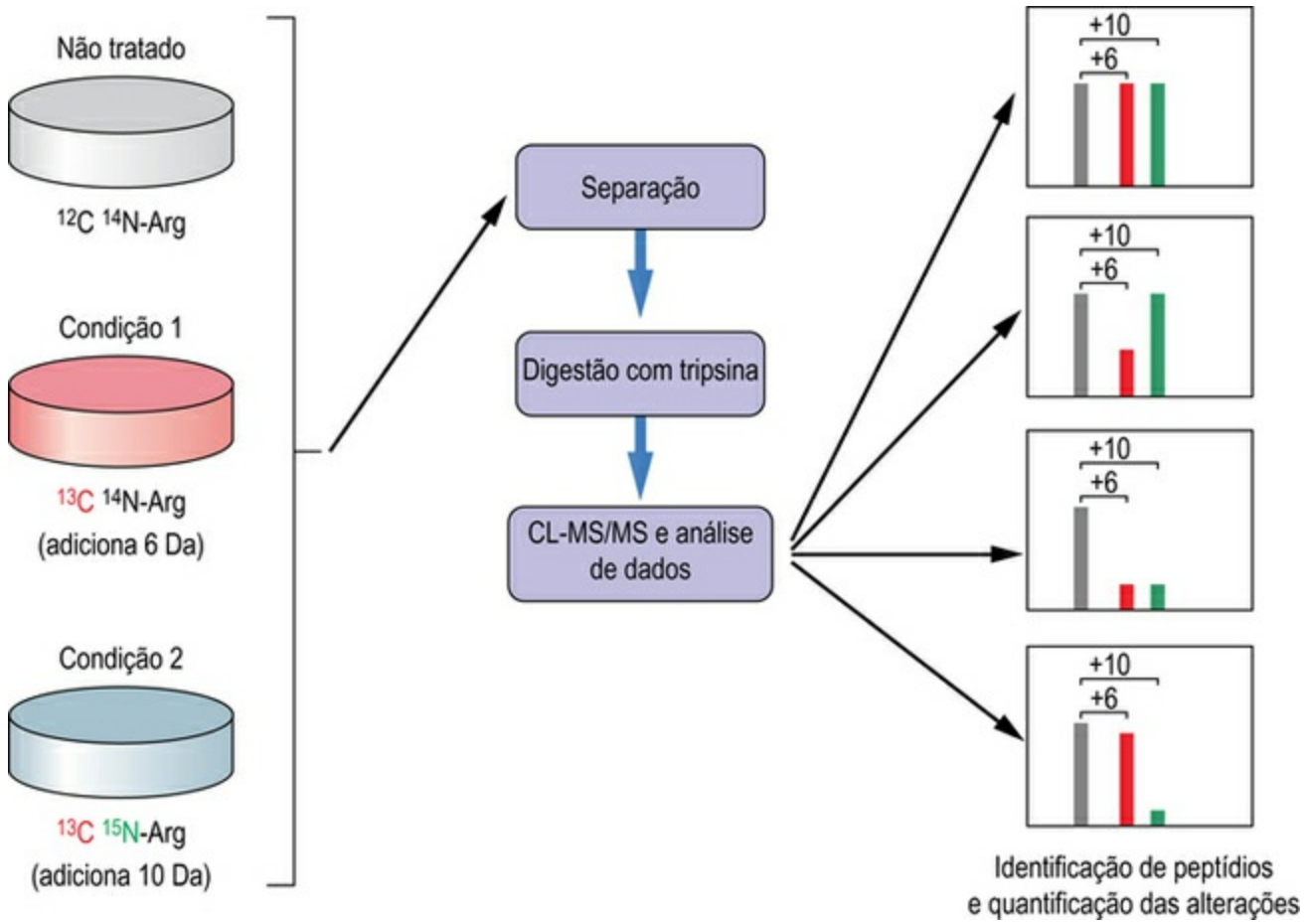


FIG. 36.13 Marcação com isótopos estáveis de aminoácidos em cultura de células (SILAC) para espectrometria de massa quantitativa. Ver texto para mais detalhes.

Métodos alternativos incluem fazer reagir quimicamente as proteínas presentes na amostra (usando, p. ex., o **marcador de afinidade codificado com isótopo [ICAT]**) ou os peptídios após a digestão da amostra (p. ex., nos **marcadores isobáricos para quantificação relativa e absoluta [iTRAQ]**), com um reagente químico "leve", ou seu equivalente "pesado" marcado isotopicamente, misturando depois as amostras e analisando-as como na abordagem para SILAC. A comparação direta das observações da 1D-CL com base nas intensidades de sinal normalizadas, sem a necessidade de marcação também é possível devido a avanços na reprodutibilidade da CL e nos programas informáticos. Adicionalmente, a contagem de íons peptídicos no espectrômetro de massa levou aos chamados **métodos de quantificação sem marcação,** que estão em rápida evolução e em breve podem permitir a quantificação precisa sem a necessidade de marcar células ou proteínas. A vantagem destas metodologias é que a análise é facilmente automatizada e as abordagens podem ser usadas para obter informação sobre as proteínas que não funcionam bem na abordagem 2DE, como as proteínas de membrana, as proteínas pequenas e as proteínas com pIs extremos (p. ex., as histonas). A desvantagem é que a informação das modificações pós-traducionais geralmente é perdida, e a digestão da amostra gera uma amostra muito mais complexa para o processo de separação.

Tecnologias com base na espectrometria de massa

Apesar de a MS permanecer a principal técnica utilizada na proteômica, uma variedade

de outros métodos está se estabelecendo. Os **microarranjos de proteínas** são conceptualmente semelhantes aos usados na transcriptômica. Estes existem em três versões (Fig. 36.14). No **arranjo de proteínas de fase reversa** (RPPA, de *reverse phase protein array*), os lisados de células ou tecidos são colocados em *spots* em uma lâmina de microscópio, com uma cobertura favorável a proteínas. Estes arranjos são, então, sondados com um anticorpo específico para uma proteína ou para uma determinada PTM. Após lavagem para remover anticorpos não ligados, os eventos de ligação bem-sucedidos são visualizados por um anticorpo secundário, que possui um marcador, usualmente um corante fluorescente. Dessa forma, um grande número de amostras ou condições de tratamento podem ser comparados simultaneamente. O sucesso desse método é totalmente dependente da especificidade do anticorpo e condicionado pela disponibilidade limitada de anticorpos monoespecíficos de alta qualidade. No **arranjo de captura,** são depositados anticorpos no arranjo, que é depois incubado com um lisado proteico. A detecção das proteínas capturadas é feita por outro anticorpo. Assim, a especificidade global resulta da sobreposição das especificidades dos anticorpos de captura e detecção, atenuando a limitação de que cada anticorpo deve ser absolutamente específico. Os **arranjos-alvo** contêm uma única espécie de proteína purificada em cada *spot*. Estes arranjos são usados para encontrar parceiros de ligação para proteínas específicas. Podem ser sondados com outra proteína purificada ou com uma mistura de anticorpos, por exemplo, do soro de um paciente, para determinar se o mesmo possui anticorpos contra proteínas particulares. Os microarranjos de proteínas podem ser usados para quantificar o conteúdo proteico presente em uma amostra e se tornarem, assim, úteis para diagnósticos clínicos.

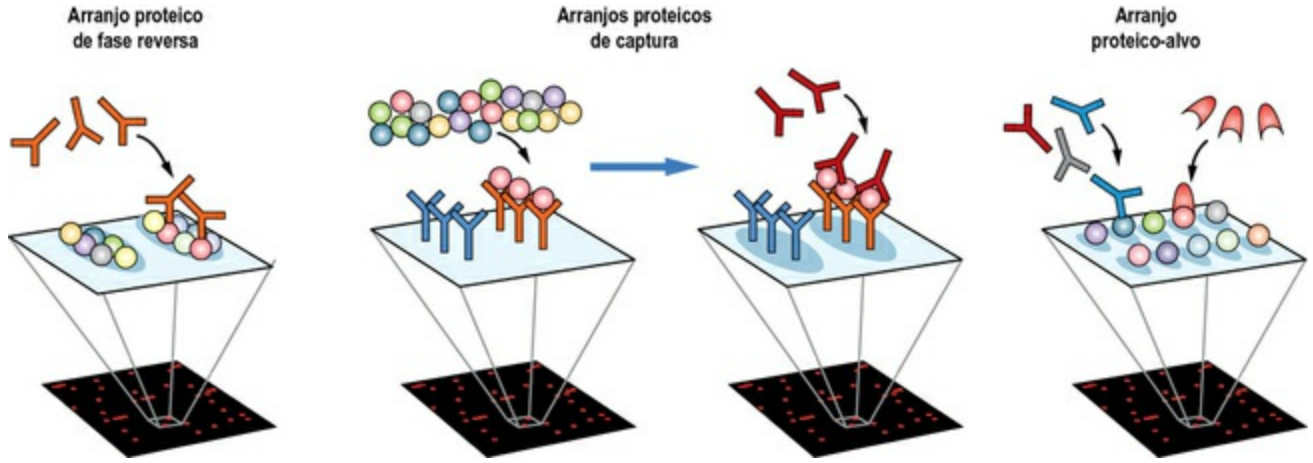


FIG. 36.14 (Micro)arranjos proteicos. Ver texto para mais detalhes.

O Atlas das Proteínas Humanas (HPA) (www.proteinatlas.org/) tem como objetivo criar anticorpos para cada proteína do proteoma humano e usá-los para visualizar proteínas e suas localizações subcelulares em tecidos humanos saudáveis e com doença

Em 2012, o HPA compreendia mais de 14.000 proteínas, isto é, aproximadamente 70% dos produtos gênicos, negligenciando-se as variantes de *splicing* e outras. Estão em curso

tentativas para incluir variantes proteicas e modificações pós-traducionais. Assim, o HPA está se tornando uma das principais fontes para a análise do proteoma.

A microscopia tornou-se também uma ferramenta frequentemente utilizada em proteômica espacial, para avaliar a localização das proteínas na célula e a forma como a localização se altera em diferentes condições. Isso tem sido possível devido aos avanços na expressão intracelular de proteínas, que são uma fusão entre as proteínas de interesse e a proteína verde fluorescente (GFP) ou seus análogos. A localização celular da proteína pode, então, ser seguida por microscopia acompanhando o sinal fluorescente da proteína a ela ligada. Existem atualmente análogos da GFP que emitem em uma grande variedade de comprimentos de onda, o que significa que três, ou até quatro proteínas podem ser seguidas paralelamente.



Quadro de conceitos avançados

Espectroscopia por ressonância magnética nuclear

A espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN) fornece informação estrutural útil acerca das moléculas que pode ser utilizada para sua identificação. Os núcleos atômicos se comportam como pequenos magnetos, pelo que quando são colocados em um campo magnético forte alinham-se com ele. A aplicação de uma energia apropriada (radiação eletromagnética por radiofrequência) faz que o núcleo gire e se alinhe contra o campo. O núcleo retorna depois ao seu estado basal, uma vez terminada a irradiação, ao girar de volta; ao fazê-lo emite frequências específicas de radiação. Estas podem ser gravadas e demonstradas em um gráfico. Cada núcleo em uma molécula que tem um ambiente único emitirá uma frequência única, e núcleos ligados entre si ou em proximidade espacial vão interagir com o núcleo adjacente (acoplamento), o que pode também ser medido. Essa valiosa informação da molécula permite que os elementos estruturais sejam determinados, e a amplitude dos sinais pode ser usada para quantificar de forma razoavelmente precisa a quantidade de material. Isso é muito útil na **metabolômica.** A principal limitação é que o espectro da RMN se torna rapidamente congestionado com informação de uma amostra complexa, pelo que é necessária alta resolução (obtida de campos magnéticos muito fortes), sendo esta técnica relativamente insensível, com um limite de detecção de três a quatro ordens de magnitude menor do que a espectrometria de massa.

Metabolômica

Os metabólitos são as pequenas moléculas químicas, como os açúcares, os aminoácidos, os lipídios e os nucleotídios, presentes em uma amostra biológica. O estudo do conteúdo metabólito de uma amostra é chamado de **metabolômica,** enquanto a análise quantitativa das alterações dinâmicas nos níveis de metabólitos como resultado de um estímulo ou outra alteração é frequentemente referida como **metabonômica.** As palavras metabolômica e metabonômica são frequentemente usadas como sinônimos, apesar de

os puristas afirmarem que, não obstante ambos envolvam a análise multiparamétrica de metabólitos, a metabonômica dedica-se à análise das alterações dinâmicas dos níveis de metabólitos, enquanto a metabolômica se foca em identificar e quantificar os níveis de metabólitos intracelulares no estado estacionário. A metabolômica é o termo genérico mais comumente utilizado.

A metabolômica fornece outro nível de informação sobre um sistema biológico

A metabolômica fornece informação acerca dos resultados da atividade de enzimas, o que pode não depender apenas da abundância da proteína, uma vez que pode ser modulada pelo fornecimento de substratos, pela concentração de cofatores ou produtos e pelo efeito de outras moléculas pequenas ou proteínas que modulam a atividade das enzimas (efetores). De certa forma, a metabolômica pode ser mais fácil de realizar do que a proteômica. No metaboloma, existe uma amplificação de qualquer alteração que ocorra no proteoma, uma vez que as enzimas transformam muitas moléculas de substrato por cada molécula de enzima. Os métodos utilizados para procurar um metabólito em cada organismo serão os mesmos, já que vários dos metabólitos serão semelhantes, ao contrário das proteínas, cujas sequências são muito menos conservadas entre organismos. Assim, as redes metabólicas são mais limitadas, o que as torna mais fáceis de seguir.

No entanto, a análise do metaboloma é, ainda assim, complexa, uma vez que é muito dinâmica; vários metabólitos dão origem a um conjunto de espécies moleculares ao formar aductos com diferentes contraíons e xenobióticos, moléculas que não derivam do hospedeiro, mas de substâncias alimentares, de fármacos, do ambiente ou até da microflora intestinal, complicando muito a análise; o atual metaboloma pode estar próximo de ser tão complicado como o proteoma.

De forma semelhante, a **lipidômica** tornou-se um tópico por direito próprio, estudando as alterações dinâmicas nos lipídios em diversas funções, como nas membranas, em lipoproteínas ou como moléculas de sinalização. Em 2007, o Projeto do Metaboloma Humano (Human Metabolome Project) lançou o primeiro esboço do metaboloma humano que consistia em 2.500 metabólitos, 3.500 componentes alimentares e 1.200 fármacos. Atualmente, existe informação sobre aproximadamente 20.000 metabólitos, 1.600 fármacos e seus metabólitos, 3.100 toxinas e poluentes ambientais e cerca de 28.000 componentes alimentares.

Os métodos mais frequentemente usados para a investigação de metabólitos são a espectrometria de massa, normalmente em conjunto com a CL, tal como usado na proteômica, e a **espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN).** A identificação de sinais correspondentes a metabólitos específicos pode depois ser utilizada para quantificar esses metabólitos em uma amostra complexa, e para ver como se modificam.

A metabolômica pode ser dividida em um conjunto de áreas

- ***Fingerprinting* metabólico:** obtenção de um "retrato" do metaboloma de um sistema, gerando um conjunto de valores para a intensidade de um sinal de uma espécie, sem

que se saiba necessariamente de que espécie se trata. Frequentemente não há separação cromatográfica das espécies. É usado para a descoberta de biomarcadores.

- **Perfil de metabólitos:** produção de um conjunto de informação quantitativa acerca de um número de metabólitos, geralmente de identidade conhecida, ao longo de uma variedade de condições ou períodos de tempo. É usado na metabolômica, metabonômica, em biologia de sistemas e na descoberta de biomarcadores.
- **Análise de metabólitos-alvo:** doseamento da concentração de metabólitos específicos ou de pequenos conjuntos de metabólitos ao longo de uma variedade de condições e tempos.

Biomarcadores

Os biomarcadores são marcadores que podem ser utilizados na medicina para detecção precoce, diagnóstico, faseamento ou prognóstico de doença, ou para determinação da terapêutica mais eficaz

Um biomarcador é geralmente definido como um marcador específico para um estado específico de um sistema biológico. Os marcadores podem ser metabólitos, peptídios, proteínas ou qualquer outra molécula biológica, ou medições de propriedades físicas, como, por exemplo, a pressão arterial. A importância dos biomarcadores está aumentando rapidamente, uma vez que a tendência para a medicina personalizada será impossível de se sustentar sem uma caracterização detalhada e objetiva dos pacientes, possibilitada pelos biomarcadores. Estes podem ter origem no próprio processo patológico ou na reação do organismo à doença. Assim, podem ser encontrados em fluidos corporais e tecidos. Para facilitar a obtenção de amostras e a colaboração do paciente, a maioria dos estudos de biomarcadores utiliza urina ou plasma, apesar de a saliva, o fluido intersticial, o aspirado de ductos mamários e o líquido cefaloespinal já terem também sido utilizados.

Os métodos mais comuns para a descoberta de biomarcadores foram desenvolvidos a partir daqueles utilizados em transcriptômica, proteômica e metabolômica, isto é, arranjos de genes, espectrometria de massa, frequentemente em conjunto com a cromatografia, e a espectroscopia por RMN

A descoberta de biomarcadores é frequentemente feita em coortes com poucos pacientes, mas, para ser clinicamente útil, é necessária uma análise estatística consistente de um grande número de amostras de indivíduos saudáveis e pacientes, em estudos bem controlados. Melhorias nos métodos de análise estatística em conjunto com métodos de detecção que podem diferenciar centenas a dezenas de milhares de componentes individuais na amostra complexa aumentaram a seletividade a um nível em que estes objetivos se tornaram alcançáveis. É usualmente necessário definir um conjunto de marcadores, isto é, um **painel de biomarcadores,** que sejam indicativos de uma dada doença de forma que atinjam seletividade ao invés de detectar apenas uma resposta sistêmica genérica, como a resposta inflamatória ou uma doença fortemente relacionada.

Em teoria, não é necessária a identificação efetiva de qual biomarcador se trata, apesar de tal procedimento poder fornecer informação acerca da bioquímica subjacente à doença, e de várias entidades reguladoras exigirem que os marcadores sejam identificados antes que um método possa ser licenciado. Isto pode também permitir o desenvolvimento subsequente de ensaios mais baratos e de maior rendimento.

Alguns exemplos bem conhecidos de biomarcadores são a medição dos níveis de glicose sanguínea no diabetes, o antígeno específico da próstata para o câncer da próstata e os genes HER-2 ou BRCA 1/2 no câncer de mama

A pesquisa de biomarcadores pode também elucidar acerca dos mecanismos patológicos e de outros marcadores ou potenciais alvos farmacológicos. Por exemplo, a utilização de uma abordagem 2DE para determinar que mecanismos de reparação de DNA foram perdidos no **câncer de mama** levou à descoberta de que os cânceres deficientes nos genes BRCA 1/2 são sensíveis à inibição de outra proteína de reparação de DNA, a poli(ADP-ribose) polimerase 1, conhecida como PARP-1. Os inibidores da PARP-1 têm-se demonstrado promissores em ensaios clínicos para o tratamento de tumores deficientes em BRCA 1/2.

A análise e interpretação de dados pela bioinformática e biologia de sistemas

As experiências das -ômicas podem gerar vários *gigabytes* e até mesmo *terabytes* de informação. No entanto, **dados não são informação e informação não é conhecimento.** A utilização destes dados é absolutamente dependente de métodos computacionais. **Bioinformática** é o termo utilizado para os métodos computacionais de extração de informação útil a partir dos complexos conjuntos de dados gerados pelas experiências das -ômicas: por exemplo, a obtenção de dados quantitativos da transcrição gênica por meio do sequenciamento de nova geração ou a identificação de proteínas a partir de fragmentos obtidos por espectrometria de massa. A anotação destes conjuntos de dados, por exemplo, com a função ou localização de uma proteína, e a organização hierárquica dos dados podem ser vistas como informação estática. A **biologia de sistemas** leva esse processo mais longe e gera modelos computacionais e matemáticos do nosso conhecimento da biologia e dos dados aperfeiçoados pela análise bioinformática. Estes modelos são usados para estimular processos bioquímicos e biológicos *in silico* (expressão que significa "desempenhado em computadores") e para revelar como sistemas complexos, como as redes de sinalização intracelular, funcionam realmente.

Resumo

- As abordagens das -ômicas possuem um enorme potencial para avaliação de risco, detecção precoce, diagnóstico, estratificação e tratamento personalizado de doenças humanas.
- As tecnologias das -ômicas estão sendo introduzidas na prática clínica, com a

genômica e a transcriptômica na liderança. Isso se deve principalmente ao fato de o DNA e o RNA terem propriedades físico-químicas definidas que são passíveis de amplificação, e também à elaboração de plataformas de ensaio consistentes, compatíveis com as rotinas dos laboratórios clínicos. Por exemplo, a PCR e o sequenciamento de DNA são usados em medicina forense para estabelecer a paternidade e para determinar a identidade das amostras de DNA deixadas em cenas de crime. Testes genéticos para o diagnóstico de mutações gênicas e doenças hereditárias estão agora estabelecidos.

- Testes de microarranjos com base em transcriptômica para o câncer de mama foram aprovados, e testes semelhantes para outras doenças estão se tornando disponíveis.
- A proteômica e a metabolômica requerem equipamentos e perícia especiais, que são difíceis de colocar em laboratórios clínicos de rotina. No entanto, o conteúdo de sua informação excede o da genômica, e com o progresso crescente da tecnologia suas aplicações clínicas tornar-se-ão realidade.
- Os benefícios das tecnologias das -ômicas são óbvios, principalmente na avaliação de risco e na elaboração de tratamentos personalizados. No entanto, existem também enormes implicações éticas inerentes à utilização dessa informação, e novas orientações reguladoras serão necessárias.

Questões para aprendizagem

1. Por que razão a informação aumenta quando se passa do estudo dos genes para o estudo das proteínas?
2. O que é um gene e como é regulada a transcrição gênica?
3. Como se podem estudar as mutações gênicas?
4. Como se pode determinar a sequência do DNA e de proteínas?

Leituras sugeridas

Bensimon, A., Heck, A. J., Aebersold, R. Mass spectrometry-based proteomics and network biology. *Annu Rev Biochem*. 2012; 81:379–405.

Chapman, E. J., Carrington, J. C. Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nat Rev Genet*. 2007; 8:884–896.

Dong, H., Wang, S. Exploring the cancer genome in the era of next-generation sequencing. *Front Med*. 2012; 6:48–55.

Eckhart, A. D., Beebe, K., Milburn, M. Metabolomics as a key integrator for 'omic' advancement of personalized medicine and future therapies. *Clin Transl Sci*. 2012; 5:285–288.

Fratkin, E., Bercovici, S., Stephan, D. A. The implications of ENCODE for diagnostics. *Nat Biotechnol*. 2012; 30:1064–1065.

Kolch, W., Pitt, A. Functional proteomics to dissect tyrosine kinase signaling pathways in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2010; 10:618–629.

Mischak, H., Allmaier, G., Apweiler, R., et al. Recommendations for biomarker identification and qualification in clinical proteomics. *Sci Transl Med*. 2, 2010. [46ps42].

Moran, V. A., Perera, R. J., Khalil, A. M. Emerging functional and mechanistic paradigms of mammalian long non-coding RNAs. *Nucleic Acids Res*. 2012; 40:6391–6400.

Osman, A. MicroRNAs in health and disease – basic science and clinical applications. *Clin Lab*. 2012; 58:393–402.

Paik, Y. K., Hancock, W. S. Uniting ENCODE with genome-wide proteomics. *Nat Biotechnol*. 2012; 30:1065–1067.

Spickett, C. M., Pitt, A. R., Morrice, N., et al. Proteomic analysis of phosphorylation, oxidation and nitrosylation in signal transduction. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1764:1823–1841.

Sites

Cancer Genome Project, US National Cancer Institute: www.cancer.gov/cancertopics/understandingcancer/CGAP

Human Metabolome Project: www.metabolomics.ca/

International HapMap Project: www.hapmap.org/

Introduction into Proteomics: www.childrenshospital.org/cfapps/research/data_admin/Site602/mainpageS602P0.html

Introduction into Metabolomics: www.docstoc.com/docs/2699139/Introduction-to-Metabolomics

Next-Generation Sequencing: http://en.wikipedia.org/wiki/DNA_sequencing# Next-generation_methods

NeXtprot protein database: www.nextprot.org/

Online Mendelian Inheritance in Man: www.ncbi.nlm.nih.gov/omim

The Human Genome Project: www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/home.shtml

Wellcome Trust Sanger Centre (UK): www.sanger.ac.uk/

CAPÍTULO 37

Oxigênio e Vida

John W. Baynes

Objetivos

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Identificar as principais espécies reativas de oxigênio (ROS) e suas fontes intracelulares.
- Identificar os alvos dos danos do oxigênio reativo e descrever os efeitos das ROS sobre as biomoléculas.
- Identificar as principais enzimas antioxidantes, vitaminas e biomoléculas que protegem contra as ROS.
- Descrever o papel do oxigênio reativo na regulação biológica e nas defesas imunológicas.
- Explicar o papel das ROS no desenvolvimento de doenças crônicas e inflamatórias.
- Descrever as funções do elemento de resposta antioxidante na proteção contra os nucleófilos e as ROS.

Introdução

À temperatura corporal, o oxigênio é um oxidante relativamente lento

O elemento oxigênio (O_2) é essencial para a vida dos organismos aeróbicos. Embora seja altamente reativo nas reações de combustão a alta temperatura, o oxigênio é relativamente inerte na temperatura do corpo, necessitando de uma elevada energia de ativação nas reações de oxidação. Isso nos favorece, pois de outra forma poderíamos entrar espontaneamente em combustão. Cerca de 90% do oxigênio que usamos estão comprometidos com a fosforilação oxidativa. Enzimas que usam O_2 para reações de hidroxilação e oxigenação consomem outros 10%, e uma fração residual, < 1%, é convertida em **espécies reativas de oxigênio (ROS)**, como o superóxido e o peróxido de hidrogênio, que são formas reativas do oxigênio. As ROS são importantes para o

metabolismo – algumas enzimas usam H_2O_2 como um substrato – e desempenham um papel na regulação do metabolismo e nas defesas imunológicas contra infecções. Entretanto elas são também fonte de dano crônico para as biomoléculas dos tecidos. Um dos riscos do aproveitamento do O_2 como substrato para o metabolismo energético é que podemos acabar, e de fato acabamos, queimados. Por esta razão temos uma gama de defesas antioxidantes que nos protege contra as ROS.

Este capítulo lidará com a bioquímica do oxigênio reativo, com os mecanismos de formação e desintoxicação das ROS e com seu papel na doença e saúde humanas.

A Não reatividade do oxigênio

Na maioria dos livros didáticos, o oxigênio é mostrado como uma molécula diatômica com duas ligações entre átomos de oxigênio. Esta é uma representação atraente do ponto de vista das estruturas eletrônicas por pontos e do emparelhamento eletrônico para formar as ligações químicas, mas está incorreta. Na verdade, à temperatura corporal, o O_2 é um birradical, uma molécula com dois elétrons desemparelhados (Fig. 37.1). Estes elétrons têm *spins* paralelos e são desemparelhados. Já que a maioria das reações de oxidação, como por exemplo, a oxidação de um alcano a álcool ou de um aldeído a ácido, é de oxidação de dois elétrons, o O_2 não é, em geral, muito reativo nessas reações. De fato, ele é completamente estável, mesmo na presença de um redutor forte como o H_2. Quando bastante calor (energia de ativação) é aplicado, um dos elétrons desemparelhados salta para formar um par de elétrons, que então participa da reação de combustão. Uma vez iniciada, a combustão fornece o calor necessário para propagar a reação, por vezes de modo explosivo.

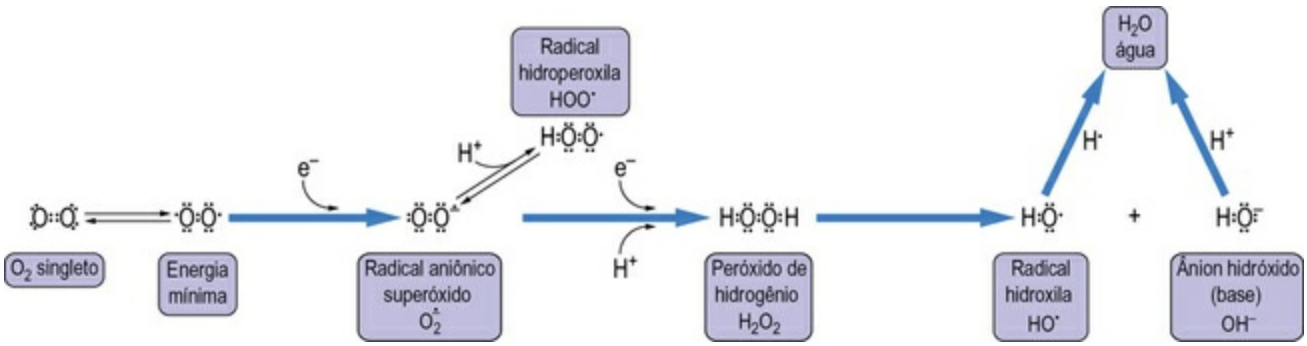


FIG. 37.1 Estrutura do oxigênio e espécies reativas de oxigênio (ROS). O oxigênio é mostrado à extrema esquerda com sua forma diatômica incorreta. Essa forma, conhecida como oxigênio singleto, existe em proporção significativa somente em altas temperaturas e em resposta à radiação. O dirradical é a forma natural de ocorrência com energia mínima (*ground-state*) do O_2 em temperatura corporal. As ROS são formas reativas, parcialmente reduzidas, do oxigênio. O primeiro produto de redução é o radical aniônico superóxido ($O_2^{\bullet-}$), que está em equilíbrio com o ácido fraco, radical hidroperoxila (pKa aproximadamente 4,5). A redução do superóxido produz o hidroperóxido O_2^{-2}, na forma de H_2O_2. A redução do H_2O_2 causa uma reação de quebra hemolítica que libera o radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) e íon hidróxido (OH^-). A água é o produto final da redução completa do O_2.

O oxigênio é ativado por íons metálicos de transição, como o ferro e o cobre, na forma ativa de metaloenzimas

Reações metabólicas acontecem à temperatura corporal, muito abaixo da temperatura requerida para ativar o oxigênio livre. Nas reações biológicas de oxirredução envolvendo o O_2, este é sempre ativado por íons metálicos redox ativos, como **ferro e cobre**; esses metais têm também pares de elétrons desemparelhados e formam complexos oximetálicos reativos. Todas as enzimas que usam O_2 *in vivo* são metaloenzimas e, na verdade, mesmo as proteínas que transportam oxigênio, hemoglobina e mioglobina contêm ferro no grupo heme (Cap. 5). Estes íons metálicos fornecem um elétron de cada vez ao oxigênio, ativando o O_2 para o metabolismo. Devido ao fato de que o ferro e o cobre, e algumas vezes o manganês e outros íons, ativam o oxigênio, esses íons metálicos redox ativos são mantidos livres em concentrações muito baixas (submicromolares) *in vivo*. Em geral são firmemente sequestrados (compartimentalizados) por proteínas de transporte e armazenamento, sendo ativados *in loco* nos sítios ativos das enzimas onde a química da oxidação pode ser contida e orientada para ocorrer sobre um substrato específico. Íons metálicos redox ativos livres são perigosos para os sistemas biológicos porque, na forma livre, eles ativam O_2, e as ROS geradas nestas reações causam danos oxidantes às biomoléculas. O dano às proteínas é frequentemente sítio-específico, ocorrendo nos sítios em que os metais se ligam às proteínas, o que indica que os complexos oximetálicos participam dos danos provocados pelas ROS *in vivo*.



Quadro clínico

Sobrecarga de ferro aumenta o risco para diabetes e cardiomiopatia

Pacientes com desordens hematológicas como hemocromatose hereditária, talassemias e anemia falciforme, ou que receberam frequentes transfusões de sangue, desenvolvem gradualmente **sobrecarga de ferro**, uma condição que aumenta o risco de desenvolvimento de cardiomiopatia e diabetes. O coração e as células β são ricos em mitocôndrias. O desenvolvimento de uma doença secundária na presença de sobrecarga de ferro é considerado o resultado do aumento da produção de ROS mitocondrial, mediado por ferro, nestes tecidos. Mutações no genoma mitocondrial podem levar a disfunção progressiva da mitocôndria, comprometendo a função cardíaca e das células β.

Espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo

ROS são formas reativas de oxigênio fortemente oxidantes

O **estresse oxidativo** é definido como uma condição em que a taxa de geração das ROS excede nossa capacidade de nos protegermos delas, dando origem a um aumento dos danos oxidantes às biomoléculas (Fig. 37.2). O estresse oxidativo é uma característica

típica das doenças inflamatórias em que células do sistema imune produzem ROS em resposta a um desafio. O estresse oxidativo pode ser localizado, por exemplo, nas articulações com artrite ou na parede vascular, na aterosclerose, ou pode ser sistêmico, como, por exemplo, no lúpus eritematoso sistêmico (LES) ou no diabetes.



FIG. 37.2 Estresse oxidativo: um desequilíbrio entre sistemas pró-oxidantes e antioxidantes. Como descrito neste capítulo, numerosos fatores contribuem para o aumento e a inibição do estresse oxidativo. AGE, produto final da glicosilação avançada; CAT, catalase; GPx, glutationa peroxidase; MPO, mieloperoxidase; SOD, superóxido dismutase.

Entre as ROS, mesmo que em concentrações micromolares ou menores, o $\mathbf{H_2O_2}$ é a que se apresenta no sangue e nos tecidos em maior concentração, sendo relativamente estável e podendo ser armazenada no laboratório ou no estojo de remédios por anos, entretanto se decompondo na presença de íons metálicos redox ativos. O **radical hidroxila** ($OH^{\bullet}$) é a espécie mais prejudicial e reativa; sua meia-vida, medida em nanossegundos, é limitada pela difusão, isto é, determinada pelo tempo de colisão com uma biomolécula-alvo. O **superóxido** ($O_2^{\bullet}$) está na posição intermediária em termos de estabilidade e pode, na verdade, servir como um agente oxidante, dando origem ao H_2O_2, ou como redutor, dando origem ao O_2. No pH fisiológico o **radical hidroperoxila** ($HOO^{\bullet}$, $pK_a < 4,5$), a forma protonada do superóxido (Fig. 37.1), representa somente uma pequena fração do total de $O_2^{\bullet-}$ (cerca de 0,1%), mas apresenta reatividade intermediária entre a do $O_2^{\bullet-}$ e do $OH^{\bullet}$. $HOO^{\bullet}$ e H_2O_2 são pequenas moléculas não carregadas que se difundem prontamente através das membranas celulares.

As **ROS são formadas por três principais mecanismos *in vivo:*** por reação do oxigênio com íons metálicos descompartimentalizados (Fig. 37.3); como uma reação colateral do transporte de elétrons nas mitocôndrias (Fig. 37.4); ou por reações enzimáticas normais, como, por exemplo, formação de H_2O_2 por oxidases de ácidos graxos no peroxissomo (Cap. 15). As ROS secundárias são também formadas por reações enzimáticas, como, por exemplo, pela mieloperoxidase, que, nos macrófagos, catalisa a reação do H_2O_2 com Cl^- para produzir outra ROS, o ácido hipocloroso (HOCl), que é a principal espécie oxidante dos alvejantes à base de cloro e também parte da maquinaria bactericida do macrófago (a seguir).

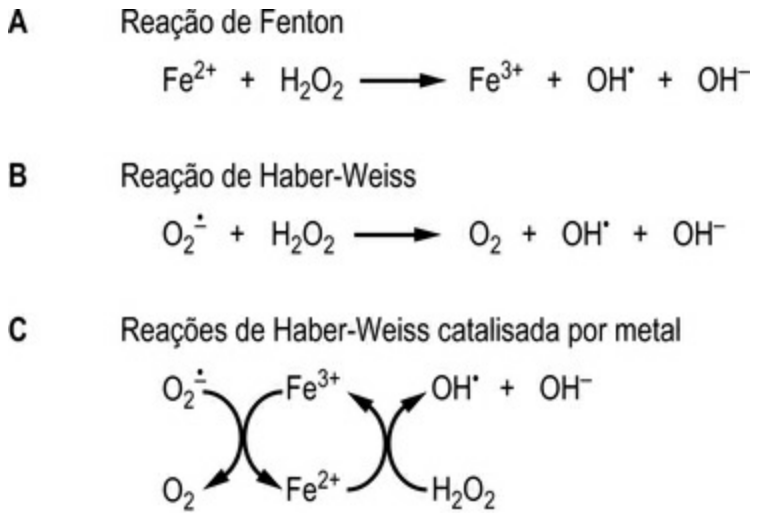


FIG. 37.3 Formação de ROS pelas reações de Fenton e Haber-Weiss. **(A)** Fenton descreveu pela primeira vez o poder oxidante de soluções de Fe^{2+} e H_2O_2. Essa reação gera o forte oxidante $OH^{\bullet}$. Cu^+ catalisa a mesma reação. **(B)** A reação de Haber-Weiss descreve a produção de $OH^{\bullet}$ a partir de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2. **(C)** Nas condições fisiológicas a reação de Haber-Weiss é catalisada por íons metálicos redox ativos.

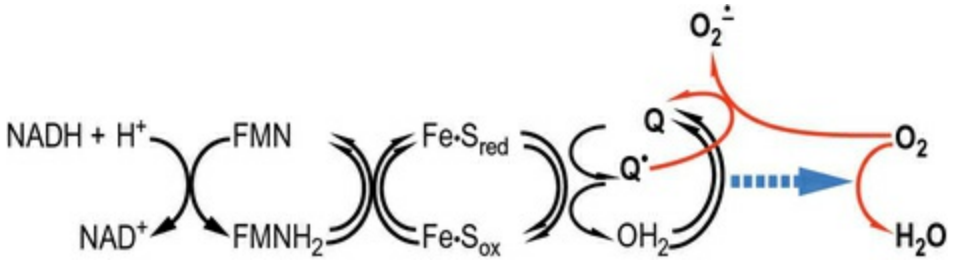


FIG. 37.4 Formação de superóxido pela mitocôndria. Depois da oxidação do NADH, a cadeia de transporte de elétrons catalisa reações redox de um único elétron. O radical semiquinona, um intermediário da redução da Q em QH_2 pelos complexos I e II, é sensível à oxidação pelo oxigênio molecular e é considerado a fonte principal dos radicais superóxidos nas células. Essa reação é aumentada tanto em alta quanto em baixa tensão de oxigênio, como, por exemplo, durante a lesão por isquemia/reperfusão (pág. 489) quando o NADH está aumentado, a cadeia transportadora de elétrons fica saturada de elétrons e o potencial de membrana está elevado.

Espécies reativas de nitrogênio e estresse nitrosativo

O peroxinitrito é uma espécie reativa de nitrogênio fortemente oxidante

A óxido nítrico sintase (NOS) catalisa a produção do radical livre óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) do aminoácido L-arginina. Existem três isoformas de NOS: nNOS no tecido neuronal, no qual o $NO^{\bullet}$ serve como neurotransmissor; iNOS no sistema imune, onde está envolvido na regulação da resposta imune; e a eNOS nas células endoteliais, onde o $NO^{\bullet}$, conhecido como o fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF), tem função na regulação do tônus vascular.



Quadro de conceitos avançados

Radioterapia: aplicação médica do oxigênio reativo

A terapia por radiação usa um feixe focalizado de elétrons altamente energizados ou raios γ de uma fonte de raios X ou de cobalto-60 para destruir o tecido tumoral. A radiação produz um fluxo de radicais hidroxila (da água) e radicais orgânicos no local do tumor. O estresse oxidativo causado no local produz dano a todas as biomoléculas no interior das células tumorais, mas o dano ao DNA é decisivo – é o que previne a replicação da célula tumoral, inibindo o crescimento do tumor. A irradiação é também usada como método para esterilização de comida, destruindo bactérias e vírus contaminantes ou infestações de insetos, o que preserva os produtos alimentares durante a estocagem por longos períodos.

A exposição à radiação ionizante vinda de explosões nucleares ou acidentes, inalação ou ingestão de elementos radioativos, como o gás radônio ou o estrôncio-90, também causa danos oxidantes ao DNA. As células que sobrevivem ao dano podem vir a apresentar mutações no DNA que, por fim, conduzirão ao desenvolvimento de cânceres. As leucemias são particularmente prevalentes por causa da rápida divisão das células da medula óssea.



Quadro clínico

Toxicidade da hiperoxia

A terapia por suplementação com oxigênio pode ser usada para o tratamento de pacientes com hipoxemia, angústia respiratória ou em consequência da exposição ao monóxido de carbono. Sob condições normobáricas a fração do oxigênio no ar pode ser aumentada para perto de 100% usando uma máscara facial ou uma cânula nasal. Entretanto pacientes desenvolvem dor torácica, tosse e dano alveolar poucas horas depois da exposição a 100% de oxigênio. O edema desenvolve-se gradualmente, vindo a comprometer a função pulmonar. O dano é resultado da superprodução de ROS nos pulmões. Ratos podem ser protegidos da toxicidade do oxigênio pelo gradual aumento da tensão de oxigênio ao longo de vários dias. Durante esse tempo enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, são induzidas nos pulmões e fornecem

proteção aumentada contra a toxicidade do oxigênio.

O pulmão não é o único tecido afetado pela hiperoxia. Crianças prematuras, especialmente aquelas com síndrome da angústia respiratória aguda, requerem frequentemente suplementação de oxigênio para sobreviver. Durante os anos 1950, reconheceu-se que a alta tensão de oxigênio usada nas incubadoras para crianças prematuras aumentava o risco de cegueira por causar a retinopatia do prematuro (fibroplasia retrolental).



Quadro clínico

Lesão por isquemia/reperfusão: um paciente com infarto do miocárdio

Um paciente sofreu um grave infarto do miocárdio, que foi tratado com ativador do plasminogênio tecidual, uma enzima capaz de dissolver coágulos (trombolítica). Durante os dias que se seguiram à hospitalização, o paciente experimentou palpitações, batimento irregular rápido do coração, fraqueza e desfalecimento. O paciente foi tratado com agentes antiarrítmicos.

Comentário

Isquemia, significando fluxo limitado de sangue, é uma condição na qual um tecido é privado de oxigênio e nutrientes. Os danos ao tecido cardíaco durante um infarto do miocárdio ocorrem não durante a fase isquêmica ou de hipoxia, mas durante a reoxigenação do tecido. Esse tipo de dano também ocorre depois de transplantes e cirurgias cardiovasculares. As ROS são consideradas importantes na lesão por reperfusão. Quando privadas de oxigênio, as células são forçadas a depender da glicólise anaeróbica e do estoque de glicogênio para a síntese de ATP. NADH e lactato se acumulam, enquanto todos os componentes do sistema de transporte mitocondrial de elétrons ficam saturados com elétrons (reduzidos), porque estes não podem ser transferidos para o oxigênio. O potencial da membrana das mitocôndrias é aumentado (hiperpolarizado) e, quando o oxigênio é reintroduzido, grandes quantidades de ROS são rapidamente produzidas, superando as defesas antioxidantes. ROS fluem por toda a célula, danificando os lipídios da membrana, o DNA e outros constituintes vitais para as células, o que leva a necrose. Suplementos e fármacos antioxidantes estão sendo avaliados para uso durante a recuperação do infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral, durante a cirurgia e para proteção dos tecidos previamente à transplantação.

Em uma reação paralela nos locais de inflamação, o $NO^{\bullet}$ reage com o $O_2^{-\bullet}$ para formar o oxidante forte peroxinitrito ($ONOO^-$), uma espécie reativa de nitrogênio (RNS). Tal como as ROS, que produzem estresse oxidativo, as RNS produzem estresse nitrosativo, reagindo com biomoléculas. O ONOOH tem muitas das propriedades fortemente oxidantes do $OH^{\bullet}$, mas possui uma meia-vida biológica maior. É também um poderoso

agente nitrante, produzindo nitrotirosina em proteínas, fosfolipídios nitrados em membranas e nucleotídeos no DNA. Pensa-se que a produção simultânea do $NO^{\bullet}$ e do $O_2^{-\bullet}$, com o aumento concomitante de $ONOO^-$ e a diminuição do $NO^{\bullet}$, limite a vasodilatação e exacerbe a hipoxia e o estresse oxidativo na parede vascular durante a lesão de isquemia-reperfusão, criando as condições para a doença vascular. O ONOOH se degrada, em parte, por clivagem homolítica, para produzir duas espécies muito reativas, o $OH^{\bullet}$ e o $NO_2^{\bullet}$. O $NO_2^{\bullet}$ é também formado por oxidação do $NO^{\bullet}$ pelo H_2O_2, catalisado pela eosinófilo peroxidase ou mieloperoxidase.

A Natureza do dano causado por radicais de oxigênio

O radical hidroxila é o mais prejudicial e o mais reativo de todas as ROS

A reação das ROS com biomoléculas resulta em produtos característicos, descritos como biomarcadores do estresse oxidativo. Esses compostos podem ser formados diretamente na reação de oxidação com a ROS ou por reações secundárias entre produtos de oxidação e outras biomoléculas. O radical hidroxila reage com biomoléculas primeiro por reações de retirada e adição de hidrogênio. Uns dos sítios mais sensíveis aos danos por radicais livres são as membranas das células, que são ricas em ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) passíveis de pronta oxidação. Danos peroxidantes sobre a membrana plasmática afetam a integridade e a função da membrana, comprometendo a capacidade da célula em manter gradientes iônicos e assimetria dos fosfolipídios da membrana. Como mostrado na Figura 37.5, quando $OH^{\bullet}$ retira o átomo de hidrogênio de um PUFA, inicia-se uma cadeia de reações de peroxidação de lipídios, produzindo produtos de oxidação secundários, peróxidos de lipídios e radicais peroxila de lipídios. Os produtos de oxidação dos lipídios formados nessa reação se degradam para formar compostos reativos, como o **dialdeído malônico** (MDA) e o **hidroxinonenal** (HNE). Esses dois compostos reagem com proteínas para formar adutos e ligações cruzadas, conhecidos como **produtos finais da lipo-oxidação avançada (ALE)**. Níveis aumentados de MDA e de adutos HNE com resíduos de lisina foram dosados em lipoproteínas no plasma e na parede vascular, na aterosclerose e na placa amiloide na doença de Alzheimer, implicando estresse e danos oxidativos na patogênese dessas doenças.

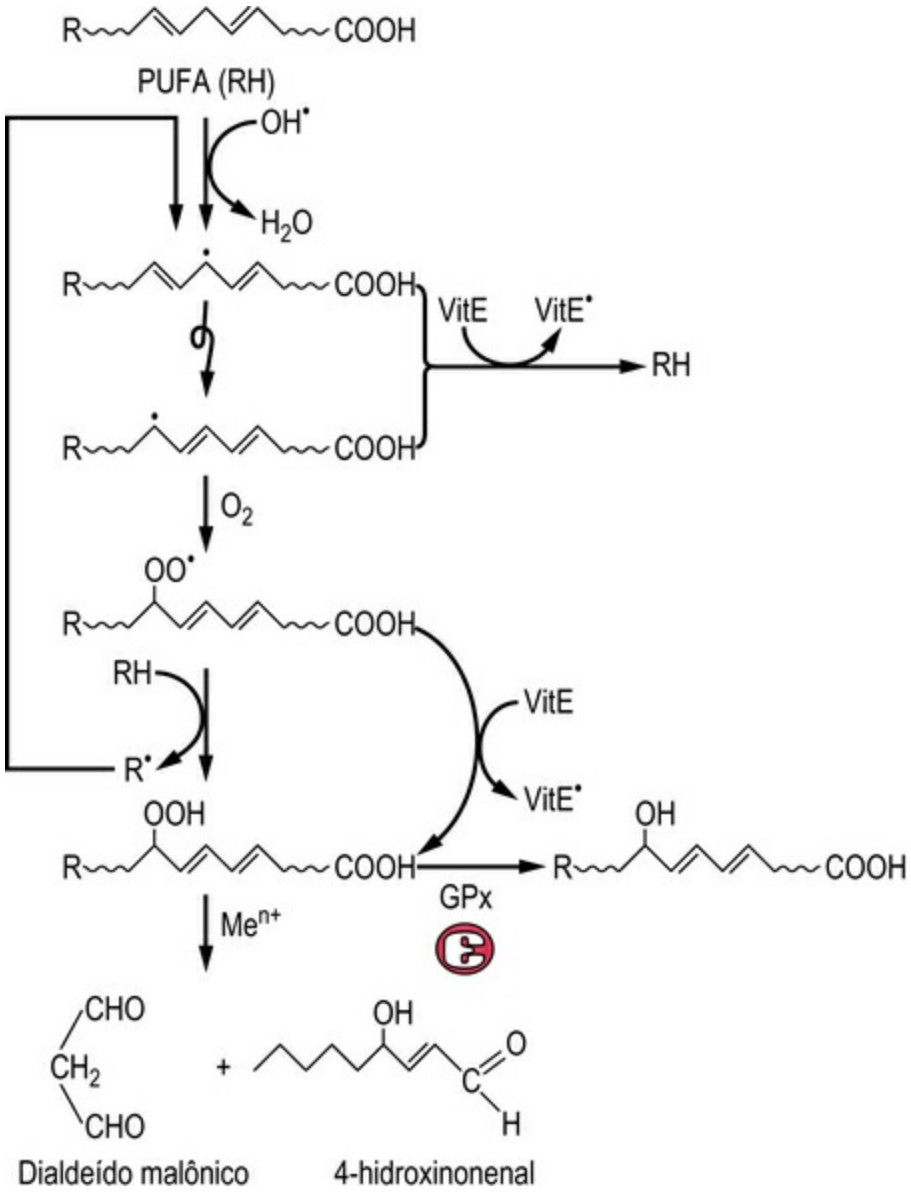


FIG. 37.5 Via da peroxidação dos lipídios. $OH^{\bullet}$ ataca PUFA, formando um radical de lipídio no carbono central. O radical se rearranja para formar um radical conjugado dienil. Esse radical reage com o O_2 do ambiente, formando um radical hidroperoxila, que então retira um hidrogênio de um lipídio vizinho para formar um peróxido de lipídio e um $R^{\bullet}$, que dá início a uma reação em cadeia. Essa reação continua até que o suprimento de PUFA acabe exaurido, a menos que ocorra uma reação de terminação. A vitamina E (a seguir) é o principal antioxidante para extinção da reação em cadeia nas membranas; ela reduz o radical conjugado dienil e o radical hidroperoxila, extinguindo a cadeia ou o ciclo das reações de peroxidação de lipídios. Os peróxidos lipídicos podem também ser reduzidos pela glutationa peroxidase (GPx), formando álcoois lipídicos inertes. Caso contrário, os peróxidos de lipídios se decompõem dando origem a uma gama de **"espécies carbonila reativas"**, como o dialdeído malônico e o hidroxinonenal, que reagem com proteínas para formar os produtos finais de lipo-oxidação avançada (ALE), que são biomarcadores de estresse oxidativo. O esquema de reação mostrado aqui para os PUFAs também ocorre com fosfolipídios intactos e ésteres de colesterol nas lipoproteínas e nas membranas celulares.

Radicais hidroxila também reagem por adição a fenilalanina, tirosina e bases dos ácidos nucleicos para formar derivados hidroxilados e ligações cruzadas (Fig. 37.6). Outras ROS e RNS deixam pistas, como a nitrotirosina formada do ONOOH e a clorotirosina formada do HOCl, e o sulfóxido de metionina, formado pela reação do H_2O_2 ou do HOCl com resíduos de metionina das proteínas (Fig. 37.6). A nitrotirosina, como os ALEs, está aumentada nas placas ateroscleróticas e de Alzheimer.

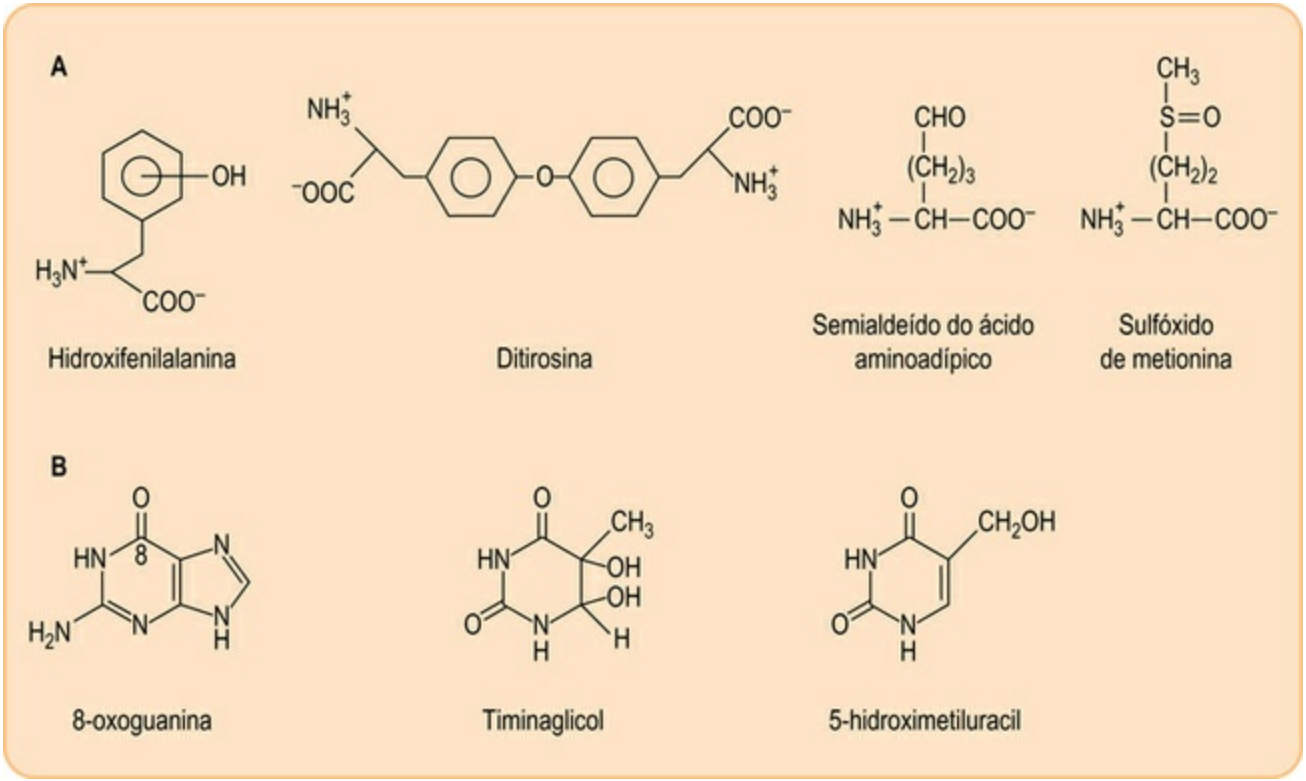


FIG. 37.6 Produtos do dano dos radicais hidroxila às biomoléculas. **(A)** Produtos da oxidação de aminoácidos: *o*-, *m*- e *p*-tirosina e ditirosina originados dos danos à fenilalanina; o semialdeído do ácido aminoadípico vem da lisina; o sulfóxido da metionina. Outros produtos incluem clorotirosina (do HOCl), nitrotirosina (do $ONOO^-$ e do $NO_2^{\bullet}$), di-hidroxifenilalanina produzida pela hidroxilação da tirosina e hidroperóxidos de aminoácidos alifáticos, como o hidroperóxido de leucina. **(B)** Produtos de oxidação de ácidos nucleicos: 8-oxoguanina é o indicador mais comumente mensurado do dano ao DNA.

As ROS também reagem com carboidratos para formar compostos carbonila reativos que reagem com proteínas formando **ligações cruzadas e adutos, conhecidos como produtos finais da glicosilação avançada (AGE).** Os AGEs estão aumentados em proteínas teciduais no diabetes como um resultado da hiperglicemia e do estresse oxidativo, e o aumento na modificação química de proteínas por AGEs e ALEs está implicado no desenvolvimento das complicações vascular, renal e da retina decorrentes do diabetes (Cap. 21).

Defesas antioxidantes

Existem vários níveis de proteção contra o dano oxidante

Os danos das ROS aos lipídios e proteínas são reparados amplamente por degradação e ressíntese. Proteínas oxidadas, por exemplo, são alvos preferidos para degradação proteossômica, e um DNA danificado é reparado por numerosos mecanismos de excisão e reparação. Tais processos não são perfeitos. Algumas proteínas, como os colágenos e as proteínas do cristalino, sofrem lenta renovação, de tal forma que o dano se acumula e suas funções podem ser atrapalhadas, como, por exemplo, o escurecimento dependente da idade das proteínas do cristalino, das ligações cruzadas da elastina e do colágeno e da perda da elasticidade ou mudanças na permeabilidade da parede vascular e da membrana basal renal (Cap. 43). A associação entre inflamação crônica e câncer indica

que a exposição crônica às ROS causa danos cumulativos no genoma na forma de mutações não letais no DNA.

Quadro de conceitos avançados

Função sentinela da metionina

Os resíduos de metionina (Met) das proteínas podem ser oxidados em sulfóxido de metionina (MetSO) por H_2O_2, HOCl ou peróxidos de lipídios. A metionina está em geral na superfície das proteínas e raramente tem papel no sítio ativo ou no mecanismo de ação das enzimas, entretanto existem evidências de que ela funcione como um "peão antioxidante", protegendo o sítio ativo das enzimas. Dos resíduos de Met da glutamina sintetase, a metade pode ser oxidada sem afetar a atividade específica da enzima. Esses resíduos são arranjados em uma fileira que "monta guarda" na entrada do sítio ativo, o que protege a enzima contra inativação por ROS. O MetSO pode ser reduzido para refazer a metionina pela metionina sulfóxido redutase, proporcionando uma amplificação catalítica do potencial antioxidante de cada resíduo de metionina.

Quadro clínico

Oxidação da metionina e enfisema

A α_1-antitripisina (A1AT) é uma proteína do plasma sintetizada e secretada pelo fígado. É um inibidor potente da elastase e protege os tecidos dos danos causados pela enzima secretada por neutrófilos durante uma inflamação. A deficiência dessa proteína (cerca de 1 em 4.000 em todo o mundo) está comumente associada ao enfisema, à doença progressiva dos pulmões e também ao dano hepático que resulta da acumulação de agregados de proteínas. O dano pulmonar é atribuído à falha da A1AT em inibir a elastase liberada por macrófagos dos alvéolos durante a fagocitose de partículas de poeira trazidas pelo ar.

O tratamento inclui terapia de reposição por infusão intravenosa semanal de um concentrado purificado de plasma ou da proteína recombinante. Fumar cigarros e a exposição à poeira mineral (carvão, sílica) exacerba a patologia em pacientes com deficiência de A1AT, mas também são fatores de risco independentes para o enfisema e a fibrose pulmonar. A fumaça do cigarro e a matéria microparticulada ativam os macrófagos pulmonares, provocando liberação de enzimas proteolíticas e aumento da produção de ROS como resultado da inflamação. As ROS causam oxidação de um resíduo específico de Met na A1AT, o que inibe irreversivelmente a atividade antielastase dessa proteína. Níveis aumentados de A1AT inativa contendo Met(O) estão presentes no plasma de fumantes crônicos.

Quadro de conceitos avançados

Selênio, um micronutriente antioxidante

A selenocisteína é um aminoácido invulgar em proteínas encontrado apenas em 25 proteínas do proteoma humano. É codificada pelo UGA, que é normalmente um códon STOP, sob a direção de uma Sequência de Inserção SElenoCisteína (SECIS), uma estrutura de haste e alça de 50 nucleotídeos no mRNA. O selenoproteoma, constituído por 25 membros, inclui cinco isozimas de glutationa peroxidase, três tiorredoxina redutases, a metionina sulfóxido redutase, uma das três enzimas que reduzem o sulfóxido de metionina a metionina e três iodotironina deiodinases. Cerca de um terço das selenoproteínas não possui função conhecida, mas parece estar envolvido em mecanismos de defesa antioxidante. O selênio é essencial à vida, em parte devido ao hipotireoidismo severo e ao estresse oxidativo que ocorrem em sua ausência. A deficiência de selênio em adultos é associada a cardiomiopatia na doença de Keshan, osteoartropatia (degeneração da cartilagem) na doença de Kashin-Beck e aos sintomas do hipotireoidismo, incluindo fadiga crônica e bócio.

Quadro de conceitos avançados

Elemento de resposta antioxidante

As células se adaptam ao estresse oxidativo induzindo enzimas antioxidantes. Muitas dessas são controladas pelo elemento de resposta antioxidante (ARE), também conhecido como elemento de resposta aos eletrófilos. O regulador central do ARE é o fator de transcrição Nrf2, que é retido em uma forma inativa no compartimento citoplasmático por ligação a uma proteína rica em cisteína, a Keap1. Em condições normais, a Keap1 dirige a ubiquitinação e a degradação proteassomal do Nrf2. Durante o estresse oxidativo, a modificação dos grupos sulfidrila da Keap1 por nucleófilos, como os produtos da peroxidação lipídica, hidroxinonenal ou acroleína, causa a dissociação do Nrf2 da Keap1. O Nrf2 se transloca então para o núcleo e ativa genes dependentes do ARE. A Keap1 também reage com nucleófilos exógenos, incluindo carcinógenos que, de outra forma, reagiriam com o DNA.

As enzimas dependentes de ARE são a catalase (CAT), a superóxido dismutase (SOD) e outras enzimas que catalisam a oxidação e a conjugação de carcinógenos e moléculas oxidantes para excretá-los. Uma dessas enzimas, a glutationa *S*-transferase hepática, catalisa a conjugação com GSH. Os conjugados são então excretados na urina como **ácidos mercaptúricos**, que são derivados *S*-substituídos da *N*-acetilcisteína.

Nossa primeira linha de defesa contra o dano oxidativo é a captação ou quelação dos íons metálicos redox ativos

Quelantes endógenos incluem numerosas proteínas ligantes de metais que aprisionam

ferro e cobre na forma inativa, como a transferrina e a ferritina, formas de transporte e estocagem do ferro. A proteína do plasma, a haptoglobina, liga-se à hemoglobina proveniente de eritrócitos rompidos e descarrega a molécula de hemoglobina para o fígado catabolizá-la. A hemopexina do plasma se liga ao heme, a forma lipídio-solúvel do ferro, que catalisa a formação de ROS nos ambientes lipídicos; ela descarrega o heme no fígado para catabolismo. A albumina, a principal proteína do plasma, tem um sítio para ligar fortemente o cobre e inibe efetivamente as oxidações catalisadas por cobre no plasma. A carnosina (β-alanil-l-histidina) e peptídeos parecidos estão presentes no músculo e no cérebro em concentrações milimolares; eles são potentes quelantes de cobre e podem ter um papel na proteção antioxidante intracelular.

A despeito desses múltiplos e potentes sistemas para quelação de metais, as ROS são continuamente formadas no corpo, tanto por enzimas como por reações espontâneas catalisadas por metais. Nesses casos, existe um grupo de enzimas que age na desintoxicação das ROS e de seus precursores. Estão aqui incluídas a **superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutationa peroxidase (GPx)** (Fig. 37.7). A SOD converte $O_2^{\bullet-}$ no menos tóxico H_2O_2. Existem duas classes de SOD: uma isozima MnSOD, que é encontrada nas mitocôndrias, e uma isozima CuZnSOD, que está largamente distribuída em toda a célula. Uma isoforma glicoproteica extracelular secretada de CuZnSOD (EC-SOD), que pode ligar-se às proteoglicanas da parede vascular, é considerada capaz de proteger contra os danos causados por $O_2^{\bullet-}$ e $ONOO^-$. A CAT, que inativa o H_2O_2, é largamente encontrada nos peroxissomos, o sítio de maior geração de H_2O_2 dentro da célula.

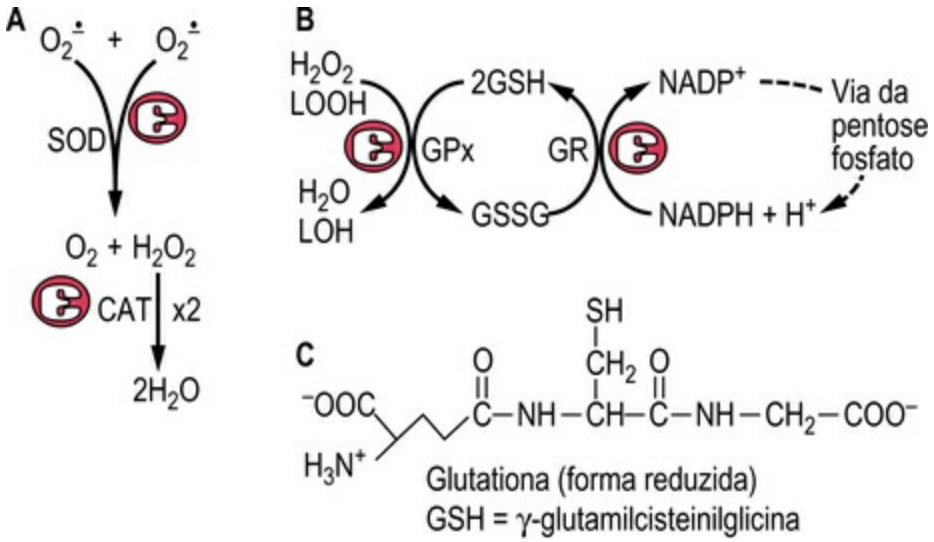


FIG. 37.7 Defesas enzimáticas contra ROS. **(A)** Superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) são dismutases que catalisam oxidação e redução de duas moléculas de substratos separados (H_2O_2); ambas são altamente específicas para seus substratos, $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2, respectivamente. **(B)** A glutationa peroxidase (GPx) reduz H_2O_2 e peróxidos de lipídios (LOOH) usando GSH como um cossubstrato. A GSH é reciclada pela glutationa redutase (GR) usando NADPH da via da pentose fosfato. **(C)** Estrutura da GSH.

A GPx está largamente distribuída no citosol, na mitocôndria e no núcleo. Ela reduz o

H_2O_2 à H_2O e os hidroperóxidos de lipídios a um álcool lipídico, usando glutationa reduzida (GSH) como um cossubstrato. A GSH é um tripeptídeo (Cap. 2) que se encontra em concentrações entre 1 e 5 mM em todas as células e é reciclada por uma enzima dependente de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (reduzido) (NADPH), a GSH redutase. O NADPH, fornecido pela via da pentose fosfato, mantém uma relação de 100:1 entre a GSH e a GSSG na célula. A GPx é uma família de isozimas contendo selênio; uma glutationa peroxidase de hidroperóxidos de fosfolipídios reduzirá os hidroperóxidos de lipídios nos fosfolipídios das lipoproteínas e das membranas, enquanto outras isozimas são específicas para ácidos graxos livres ou hidroperóxidos de ésteres de colesterol. Também existe uma isoforma de GPx nas células epiteliais do intestino, cujo papel considera-se que seja desintoxicar os hidroperóxidos da dieta, como, por exemplo, dos alimentos fritos.

A vitamina C é o antioxidante por excelência nos sistemas biológicos

Três vitaminas antioxidantes, A, C e E, fornecem a terceira linha de defesa contra os danos oxidativos. Essas vitaminas, sobretudo a vitamina C (ascorbato) (Fig. 37.8) na fase aquosa e a vitamina E (α- e γ-tocoferol) (Fig. 37.9) na fase lipídica, agem como antioxidantes que interrompem reações em cadeia (Fig. 37.5). Elas agem como agentes redutores, doando um átomo de hidrogênio ($H^{\bullet}$) e extinguindo radicais orgânicos formados por reação das ROS com biomoléculas. Os radicais de vitaminas C e E produzidos nessa reação são espécies estáveis quanto à ressonância e não reativos; eles não propagam os danos por radicais e são enzimaticamente reciclados, por exemplo, pela desidroascorbato redutase (Fig. 37.8). A vitamina C reduz radicais superóxido e peroxila, mas também tem um papel especial na redução e reciclagem da vitamina E. Em resposta ao estresse oxidativo grave a vitamina C recicla a vitamina E, de forma que a concentração da vitamina E é mantida constante na fase lipídica até que toda a vitamina C tenha sido consumida (Fig. 37.9). Esses antioxidantes atuam juntos para inibir as reações de peroxidação de lipídios nas lipoproteínas do plasma e nas membranas. A vitamina A (caroteno) (Cap. 11) também é um antioxidante lipofílico. Ainda que mais bem compreendida por seu papel na visão, ela é um potente captador do oxigênio singleto e protege a retina e a pele contra os danos da luz solar.

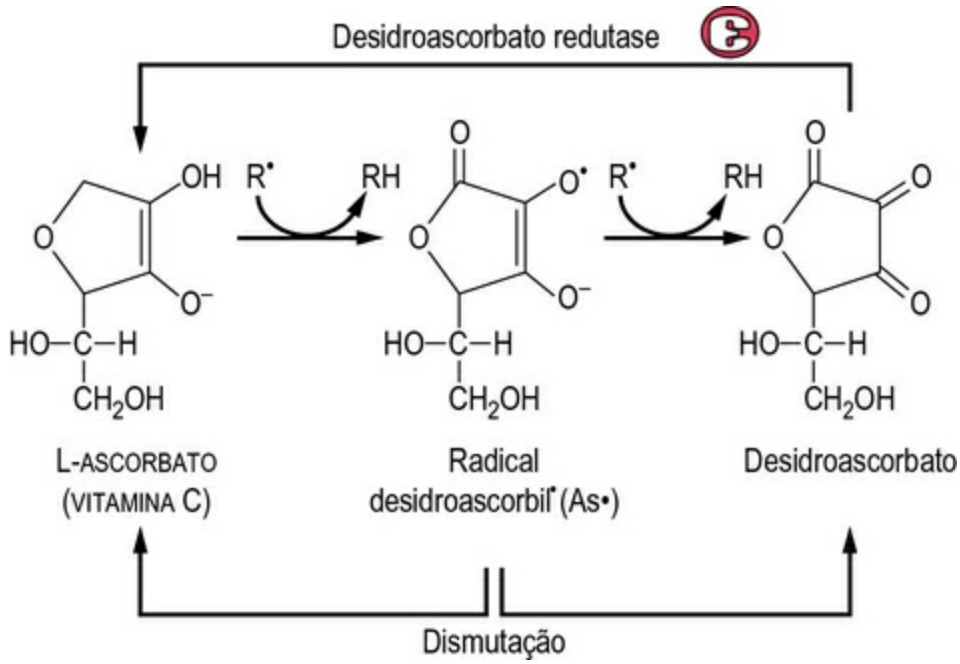


FIG. 37.8 Atividade antioxidante do ascorbato. A vitamina C existe como um ânion enolato em pH fisiológico. O ânion enolato reduz espontaneamente os radicais superóxidos, orgânicos ($R^{\bullet}$) e a vitamina E, formando um radical desidroascorbil ($As^{\bullet}$). O radical desidroascorbil pode dismutar a ascorbato e a desidroascorbato. O desidroascorbato é reciclado pela desidroascorbato redutase, uma enzima GSH-dependente presente em todas as células.

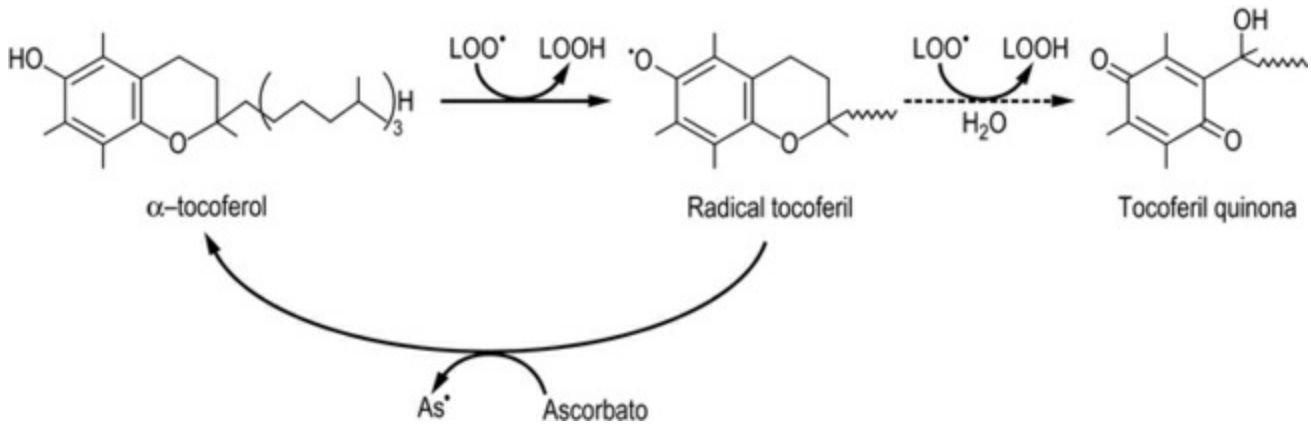


FIG. 37.9 Atividade antioxidante da vitamina E. O termo vitamina E se refere a uma família de isômeros de tocoferol e tocotrienol com atividade de potente antioxidante lipofílico e de estabilização da membrana. Os tocoferóis reduzem radicais hidroperoxila e também inativam o oxigênio singleto. O α-tocoferol é a forma mais efetiva nos seres humanos e a forma principal de vitamina E, da dieta. Ele consiste em uma estrutura em anel de cromanol com uma cadeia lateral poli-isoprenoide que auxilia a ancoragem da vitamina nas membranas; as unidades de isopreno são insaturadas em tocotrienol. Os isômeros α, β, γ e δ diferem no padrão de grupos metila no anel de benzeno (Fig. 11.3). A principal forma comercial da vitamina E é o acetato de α-tocoferol, que é mais estável que o tocoferol livre durante a estocagem. O radical tocoferil, o principal produto formado durante a ação antioxidante da vitamina E, é reciclado pelo ascorbato. A tocoferil quinona também é formada em baixas quantidades.

A glutationilação de proteínas – proteção contra as ROS sob estresse

Apesar da multiplicidade de mecanismos de defesa, existe sempre alguma evidência de dano oxidativo em curso nos tecidos. Em condições fisiológicas, quando as proteínas são

expostas ao O_2, seus grupos sulfidrila gradualmente se oxidam para formar dissulfetos, tanto intra como intermolecularmente com outras proteínas. Este é um processo com múltiplos passos. Primeiramente, um grupo sulfidrila de uma proteína é oxidado em **ácido sulfênico** (PrSOH) por uma ROS, como o H_2O_2 ou o HOCl; em seguida, o ácido sulfênico reage com outro PrSH para formar uma proteína contendo ligações cruzadas PrS-SPr. Essas proteínas com ligações cruzadas são reduzidas pela glutationa para formar glutationa oxidada e regenerar a proteína nativa com grupos sulfidrila livres. A sequência de reações é

$$\mathrm{PrSH} + \mathrm{ROS} \rightarrow \mathrm{PrSOH}$$
$$\mathrm{PrSOH} + \mathrm{PrSH} \rightarrow \mathrm{PrS-SPr} + \mathrm{H_2O}$$
$$\mathrm{PrS-SPr} + 2\mathrm{GSH} \rightarrow 2\mathrm{PrSH} + 2\mathrm{GSSG}$$

Durante o estresse oxidativo, há um aumento significativo das proteínas *S*-glutationiladas (PrS-SG) na célula. Neste caso, a sequência de reações é

$$\mathrm{PrSH} + \mathrm{ROS} \rightarrow \mathrm{PrSOH}$$
$$\mathrm{PrSOH} + \mathrm{GSH} \rightarrow \mathrm{PrS\text{-}SG} + \mathrm{H_2O}$$
$$\mathrm{PrS\text{-}SG} + \mathrm{GSH} \rightarrow \mathrm{PrSH} + \mathrm{GSSG}$$

A *S*-**glutationilação** é revertida por redução não enzimática pela GSH (acima) ou por enzimas usando cofatores proteicos tiol (tiorredoxina, glutarredoxina). Essa via inibe a formação de agregados contendo ligações cruzadas, como os **corpos de Heinz**, que são precipitados de hemoglobina que se desenvolvem nos eritrócitos na deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase, caracterizada por baixos níveis de GSH (Cap. 12). Considera-se que a *S*-glutationilação possa ter um papel dual não só na proteção da cisteína contra a oxidação irreversível ao ácido sulfínico ou sulfônico durante o estresse oxidativo e/ou nitrosativo, mas também na modulação do metabolismo celular (regulação redox). As proteínas-alvo incluem uma gama alargada de enzimas com grupos -SH no sítio ativo ou reguladores, como a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase na glicólise e as proteínas cinases nas cascatas de sinalização, assim como as chaperonas e as proteínas transportadoras. A *S*-glutationilação parece também proteger as proteínas da degradação proteassomal mediada pela ubiquitina durante o estresse oxidativo.

Os efeitos benéficos das espécies reativas de oxigênio

As ROS são essenciais a muitas vias metabólicas e de sinalização

Embora a maior parte deste capítulo tenha focalizado os aspectos perigosos do oxigênio reativo, vale a pena fechá-lo com algum reconhecimento de que há efeitos benéficos das ROS, entre os quais estão as funções de regulação do NO, o papel das ROS na ativação do elemento de resposta antioxidante (ARE), a necessidade de ROS na atividade bactericida dos macrófagos e o uso de ROS como substratos para enzimas, como, por exemplo, H_2O_2 para as hemeperoxidases envolvidas na iodinação do hormônio da tireoide. Crescem também as evidências de que as ROS, particularmente o H_2O_2, são moléculas de sinalização importantes envolvidas na regulação do metabolismo. Estima-se que a concentração tecidual de H_2O_2 seja na faixa submicromolar; as estimativas variam grandemente, de 1 a 700 nmol/L, entretanto mudanças significativas na concentração de H_2O_2 ocorrem em resposta a citocinas, fatores de crescimento e estimulação biomecânica. O fato de que esses eventos de sinalização sejam inibidos por captadores de peróxidos ou por superexpressão da catalase implica o H_2O_2 na cascata de sinalização. O sinal da insulina, por exemplo, parece envolver H_2O_2 como parte de um mecanismo para inativação reversível de algumas tirosina fosfatases de proteínas, ao mesmo tempo em que tirosina cinases de proteínas são ativadas pelo receptor de insulina (Cap. 21). À medida que as evidências de que o H_2O_2 tem o papel de sinalização tornam-se mais convincentes, aumenta o interesse na pesquisa sobre o papel regulatório do superóxido.



Quadro de teste clínico

Atividade da peroxidase para detecção de sangue oculto

As peroxidases, como a glutationa peroxidase (GPx), são enzimas que catalisam o oxidação de um substrato usando H_2O_2. A hemoglobina e o heme têm uma atividade de pseudoperoxidase *in vitro*. No teste para sangue oculto baseado no guáiaco, uma amostra de fezes é aplicada em um pequeno cartão contendo ácido guáiaco. A hemoglobina presente na amostra de fezes oxida os compostos fenólicos no ácido guáiaco a quinonas. Um teste positivo é indicado por uma marcação azul rodeando o limite da mancha fecal. Hemoglobina e mioglobina parcialmente digeridas de carne animal e algumas peroxidases de plantas podem resultar em falsos positivos. Ensaios similares dependentes de peroxidase são usados para identificar manchas de sangue em cenas de crimes.



Quadro de conceitos avançados

A Via da glioxilase: um papel especial para a glutationa

Uma fração pequena dos fosfatos de triose produzidos durante o metabolismo se degrada espontaneamente para formar **metilglioxal** (MGO), um açúcar dicarbonil-reativo. O MGO também é formado durante o metabolismo da glicina, da treonina e como um produto de oxidação não enzimática de carboidratos e lipídios – sendo um

precursor importante de produtos finais de glicosilação (AGE) e lipo-oxidação (ALE) avançadas (Caps. 21 e 43). O MGO reage primeiro com resíduos de arginina nas proteínas, mas também com lisina, histidina e cisteína, produzindo inativação de enzimas e ligações cruzadas entre proteínas.

O MGO é inativado por enzimas da via da glioxilase, que é um sistema GSH-dependente encontrado em todas as células do corpo. A via da glioxilase (Fig. 37.10) consiste em duas enzimas que catalisam uma reação redox interna na qual o carbono-1 do MGO é oxidado de um grupo aldeído em um grupo ácido carboxílico e o carbono-2 é reduzido de uma cetona a um álcool secundário. O produto final, d-lactato, não reage com proteínas; o d-lactato é diferente do l-lactato, o produto da glicólise, mas pode ser convertido em l-lactato para metabolismo posterior.

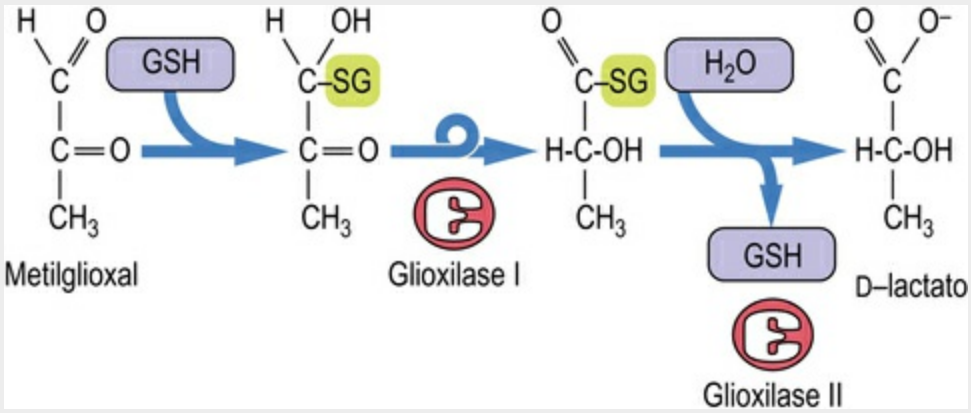


FIG. 37.10 O sistema glioxilase. A glioxilase I catalisa a formação de um aduto tio-hemiacetal entre a GSH e o MGO e seu rearranjo a um tioéster. A glioxilase II catalisa a hidrólise do tioéster formando o d-lactato e regenerando a GSH. Diferentemente da GPx, essa via não consome GSH.

Os níveis de MGO e d-lactato estão aumentados no sangue de pacientes diabéticos porque os níveis de glicose e intermediários da glicólise, incluindo triose fosfatos, estão altos dentro das células no diabetes. O sistema da glioxilase também inativa o glioxal e outros açúcares dicarbonil produzidos durante a oxidação não enzimática de carboidratos e lipídios. Inibidores de glioxilase estão sendo avaliados para quimioterapia, porque células cancerosas parecem ser mais sensíveis aos inibidores de glioxilase, talvez por causa da sua dependência aumentada de glicose.

Quadro de conceitos avançados

O Surto respiratório nos macrófagos

Como delineado na Figura 37.11, os macrófagos iniciam uma sequência de reações produtoras de ROS durante o surto de consumo de oxigênio associado à fagocitose. A **NADPH oxidase** da membrana plasmática do macrófago é ativada para produzir $O_2^{\bullet-}$, que então é convertido em H_2O_2 pela superóxido dismutase. O H_2O_2 é usado por outra enzima do macrófago, a mieloperoxidase (MPO), para oxidar o íon cloreto, ubíquo nos fluidos corporais, em ácido hipocloroso (HOCL). O H_2O_2 e o HOCl servem como

agentes bactericidas porque atuam na degradação oxidativa de lipídios, proteínas e DNA das bactérias. O macrófago tem uma alta concentração intracelular de antioxidantes, especialmente o ascorbato, para proteger-se durante a produção de ROS, mas seu tempo de vida relativamente curto, 2-4 meses, sugere que não é imune ao dano oxidativo.

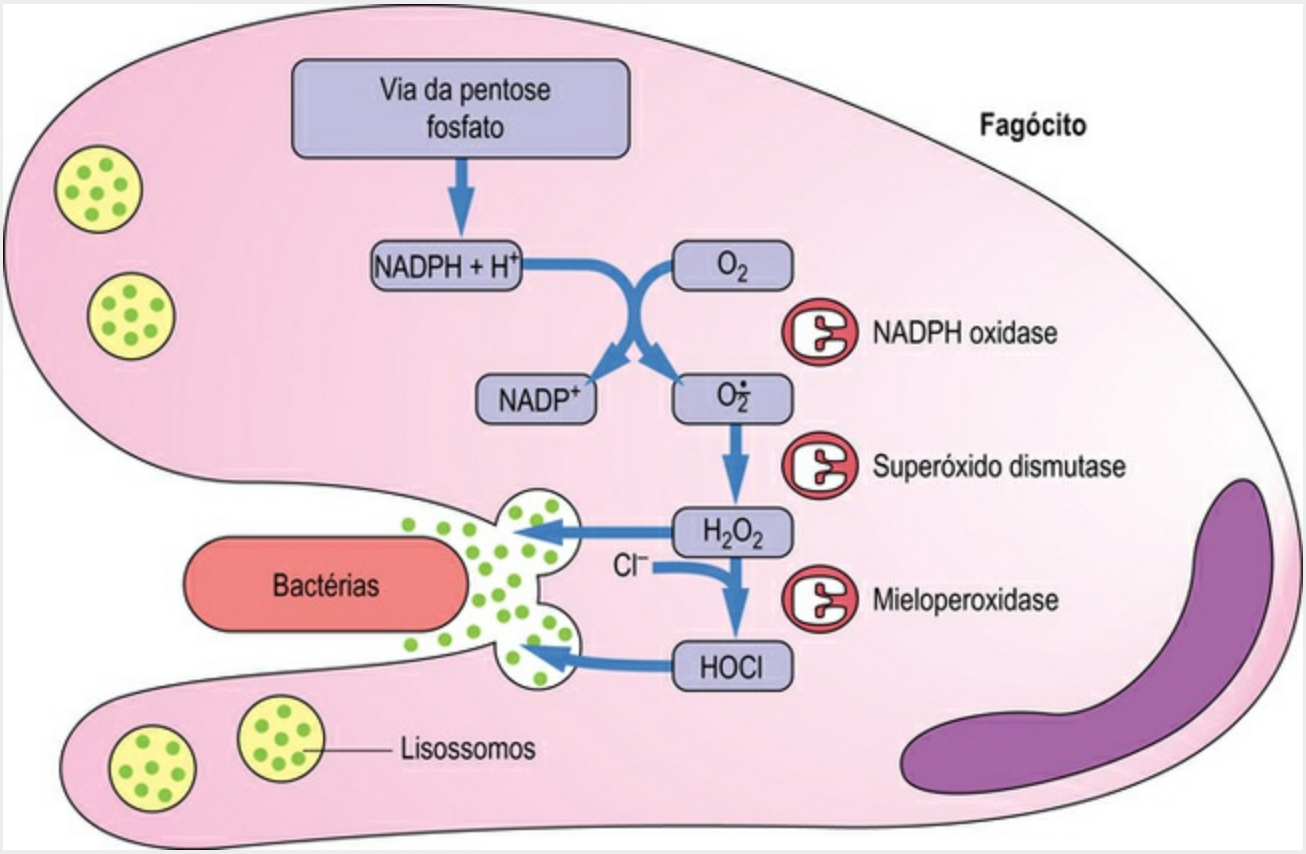


FIG. 37.11 Geração e liberação de ROS durante a fagocitose. Uma cascata de reações que geram ROS é iniciada durante a fagocitose para matar organismos invasores. Enzimas hidrolíticas são liberadas dos lisossomos para ajudar na degradação dos restos microbianos.

O consumo de O_2 pela NADPH oxidase é responsável pelo **"surto respiratório"**, o aumento abrupto do consumo de O_2 para produção de ROS, que se segue à fagocitose. O produto final dessa sequência de reações, o HOCL, é também o oxidante ativo dos alvejantes que contêm cloro. De fato, a infusão intravenosa de soluções diluídas de HOCl foi usada para o tratamento da septicemia bacteriana nos hospitais de campanha durante a Primeira Guerra Mundial, antes do advento da penicilina e de outros antibióticos. A doença granulomatosa crônica (CGD) é uma condição herdada que resulta de um defeito genético na NADPH oxidase. A incapacidade de produzir superóxido leva a infecções bacterianas e fúngicas que põem a vida em risco.

Quadro de conceitos avançados

Defesas antioxidantes nos eritrócitos

As hemácias ou eritrócitos não usam oxigênio para seu metabolismo nem

participam de fagocitose. Entretanto, por causa da alta tensão de O_2 no sangue arterial e do conteúdo de ferro do grupo heme das hemácias, as ROS são continuamente formadas nas mesmas. A hemoglobina (Hb) produz espontaneamente o superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em uma reação secundária menor associada à ligação do O_2. A redução ocasional do O_2 em $O_2^{\bullet-}$ é acompanhada de oxidação da Hb (ferro) normal em metemoglobina (ferriemoglobina), uma proteína marrom-enferrujada que não liga ou transporta O_2. A **metemoglobina** pode liberar heme, que reage com $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 em reações tipo Fenton para produzir radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) e espécies reativas de oxoferro. Essas ROS iniciam reações de peroxidação de lipídios que podem conduzir à perda da integridade da membrana e à morte celular.

O eritrócito é bem fortificado com defesas antioxidantes para proteger-se contra o estresse oxidativo. Existem atividades de catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutationa peroxidase (GPx), bem como de metemoglobina redutase que reduzem a metemoglobina de volta em ferroemoglobina normal. Normalmente, menos de 1% da Hb está presente como metemoglobina, entretanto pessoas com **metemoglobinemia** congênita, resultante de deficiência de metemoglobina redutase, têm tipicamente uma aparência cianótica ou escura. O tratamento com grandes doses de ascorbato (vitamina C) é usado para reduzir sua metemoglobina à hemoglobina funcional.

A GSH, em torno de 2 mmol/L nos eritrócitos, não somente sustenta as defesas antioxidantes, mas é também um importante tampão de sulfidrilas, o que mantém grupos -SH na hemoglobina e nas enzimas em estado reduzido.

Resumo

- Espécies reativas de oxigênio são as centelhas produzidas pelo metabolismo oxidativo, e o estresse oxidativo pode ser encarado como o preço que pagamos por usar o oxigênio em nosso metabolismo.
- ROS e RNS, como o superóxido, o peróxido, o radical hidroxila e o peroxinitrito, são reativos e tóxicos, algumas vezes difíceis de conter, mas sua produção é importante para a regulação do metabolismo, a renovação (*turnover*) de biomoléculas e a proteção contra infecção microbiana.
- ROS e RNS causam danos oxidativos em todas as classes de biomoléculas: proteínas, lipídios e DNA.
- Existem numerosos mecanismos de proteção antioxidante que incluem captação de íons metálicos redox ativos, inativação enzimática das principais ROS, inativação de radicais orgânicos por moléculas pequenas, como a GSH e as vitaminas, e, quando tudo o mais falha, reparo e/ou renovação (*turnover*) e, em caso extremo, apoptose.
- Biomarcadores de estresse oxidativo são prontamente detectados em tecidos sob inflamação, e o estresse oxidativo tem sido cada vez mais implicado nas patogenias das doenças crônicas relacionadas com a idade.
- Apesar de suas ações danosas, as ROS são também essenciais a muitas funções normais do sistema imune e a muitas enzimas e vias de sinalização.

Questões para aprendizagem

1. Reveja a evidência de que a aterosclerose é uma doença inflamatória que resulta da superprodução de ROS na parede vascular.
2. Discuta a evidência de que a hiperglicemia no diabetes induz a um estado de estresse oxidativo que leva a complicações renais e vasculares.
3. Reveja os dados sobre uso de antioxidantes na terapia da aterosclerose e do diabetes. Tomando por base estes estudos, quão forte são as evidências de que essas doenças são resultado de estresse oxidativo crescente?
4. Discuta as vantagens recentes do uso de antioxidantes para a proteção de órgãos e tecidos durante cirurgias e transplantes.

Leituras sugeridas

Burgoyne, J. R., Oka, S. I., Ale-Agha, N., et al. Hydrogen peroxide sensing and signaling by protein kinases in the cardiovascular system. *Antioxid Redox Signal*. 2013; 18:1042–1052.

Ferrari, C. K., Souto, P. C., França, E. L., et al. Oxidative and nitrosative stress on phagocytes' function: from effective defense to immunity evasion mechanisms. *Arch Immunol Ther Exp*. 2011; 59:441–448.

Greenough, M. A., Camakaris, J., Bush, A. I. Metal dyshomeostasis and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurochem Int*. 2013; 62:540–555.

Riccioni, G., D'Orazio, N., Salvatore, C., et al. Carotenoids and vitamins C and E in the prevention of cardiovascular disease. *Int J Vitam Nutr Res*. 2012; 82:15–26.

Tkachev, V. O., Menshchikova, E. B., Zenkov, N. K. Mechanism of the Nrf2/Keap1/ARE signaling system. *Biochemistry (Mosc)*. 2011; 76:407–422.

Zhang, H., Forman, H. J. Glutathione synthesis and its role in redox signaling. *Semin Cell Dev Biol*. 2012; 23:722–728.

Zhang, Y., Tocchetti, C. G., Krieg, T., et al. Oxidative and nitrosative stress in the maintenance of myocardial function. *Free Radic Biol Med*. 2012; 53:1531–1540.

Sites

Antioxidants and cancer: www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/ antioxidantsprevention

Free radical lectures: http://web.mst.edu/~nercal/documents/chem464/lectures/Lec01_FreeRadicals.pdf

Oxidative stress and disease: www.oxidativestressresource.org/

Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: http://lpi.oregonstate.edu/f-w97/reactive.html

Virtual Free Radical School: www.sfrbm.org/sections/education/frs-presentations

CAPÍTULO 38

A Resposta Imune

J. Alastair Gracie and †Alex Farrell

Objetivos

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Comparar e diferenciar a base das respostas imunes inata e adaptativa.
- Caracterizar os elementos celulares e humorais quer da resposta imune inata, quer da adaptativa.
- Comparar e diferenciar o reconhecimento de antígenos por células das respostas imunes inata e adaptativa.
- Descrever as características-chave de uma resposta inflamatória.
- Salientar as funções das citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão durante as respostas imunes.
- Descrever a principal função dos subtipos de células T na resposta imune celular adaptativa.
- Descrever a base da diversidade dos anticorpos.
- Apreciar as consequências de respostas imunes aberrantes, que podem resultar em imunodeficiência, hipersensibilidade ou autoimunidade.

Introdução

O sistema imune evoluiu para produzir uma resposta coordenada de forma a proteger o hospedeiro da infecção em curso e removê-la

A chave para isso é a capacidade de distinguir o que é "próprio" do que não é, enquanto se procura manter a homeostasia corporal. A imunidade pode ser categorizada como sendo **inata (inespecífica)** ou **adaptativa (adquirida/específica).** Respostas inapropriadas tanto ao que é próprio quanto àquilo que não é podem resultar em condições mediadas pela imunidade, como a **autoimunidade** ou a **hipersensibilidade.** Além disso, a

importância de uma resposta imune saudável e eficiente pode ser vista em indivíduos que têm um dos muitos **estados de imunodeficiência.** Eles podem apresentar-se em uma gama de doenças, desde infecções menores recorrentes até doenças potencialmente fatais, dependendo da gravidade da condição. O sistema imune parece muitas vezes demasiado complicado. Com efeito, a coleção complexa de células e moléculas evoluiu de forma que eliminasse os praticamente infinitos organismos infecciosos com que poderemos entrar em contato, causando lesão mínima e, em última instância, resolvendo a situação. O fundamento para isso é a capacidade de reconhecer o patógeno. As seções seguintes descreverão como os mecanismos envolvidos em respostas inatas e adaptativas diferem.

Resposta imune inata

Quando ativada, a resposta inata é vista como uma resposta inflamatória

A imunidade inata é a resposta imediata do organismo e a primeira linha de defesa. A resposta imune inata protege o organismo do ataque, usando barreiras físico-químicas, como a pele, os epitélios mucosos e seus produtos de secreção associados, por exemplo, o suor, o muco e o ácido. É frequentemente referida como "natural" ou "não específica", já que parece ser preexistente. **Quando ativada, a resposta inata é frequentemente vista como uma resposta inflamatória.** A inflamação é a resposta corporal à lesão ou dano tissular. Seu objetivo é limitar — e, então, reparar — o dano causado por qualquer agente lesivo. Ela envolve a interação da microvasculatura, células sanguíneas circulantes, outras células imunes nos tecidos e suas moléculas efetoras secretadas. A ativação endotelial, o aumento da permeabilidade e da vasodilatação permitem que os leucócitos normalmente circulantes migrem para os tecidos onde, juntamente com outras células imunes aí residentes, montem uma resposta eficiente e rápida na tentativa de eliminar o patógeno (Tabela 38.1). Isso incluirá muitas vezes a liberação de mediadores tóxicos e a fagocitose, um processo descrito pela primeira vez há mais de cem anos por Mechnikov, que observou células "comendo" patógenos.

Tabela 38.1

Células envolvidas na inflamação

	Circulantes	No tecido
Leucócitos polimorfonucleares		
Neutrófilo	Sim	Migram se necessário
Eosinófilo	Sim	Migram se necessário
Basófilo	Sim	Migram se necessário
Mastócito		Sim
Fagócitos mononucleares	Monócito	Macrófago
Linfócitos (principalmente parte da resposta adaptativa)	Sim	Migram se necessário
Células endoteliais		Sim

Os mediadores inflamatórios contribuem para a resposta imune

As células da imunidade inata, quando ativadas, podem sintetizar e secretar uma ampla diversidade de diferentes substâncias químicas solúveis chamadas mediadores inflamatórios. Algumas podem ser diretamente tóxicas para o patógeno, enquanto outras (citocinas) podem ser liberadas na tentativa de sinalizar, recrutar e ativar outras células imunes, de forma que auxiliem a resposta. O fígado também produz alguns destes mediadores, presentes no sangue, incluindo substâncias de fase aguda, como a proteína C reativa (CRP) (Cap. 4) e componentes do sistema complemento descritos a seguir (Fig. 38.1).

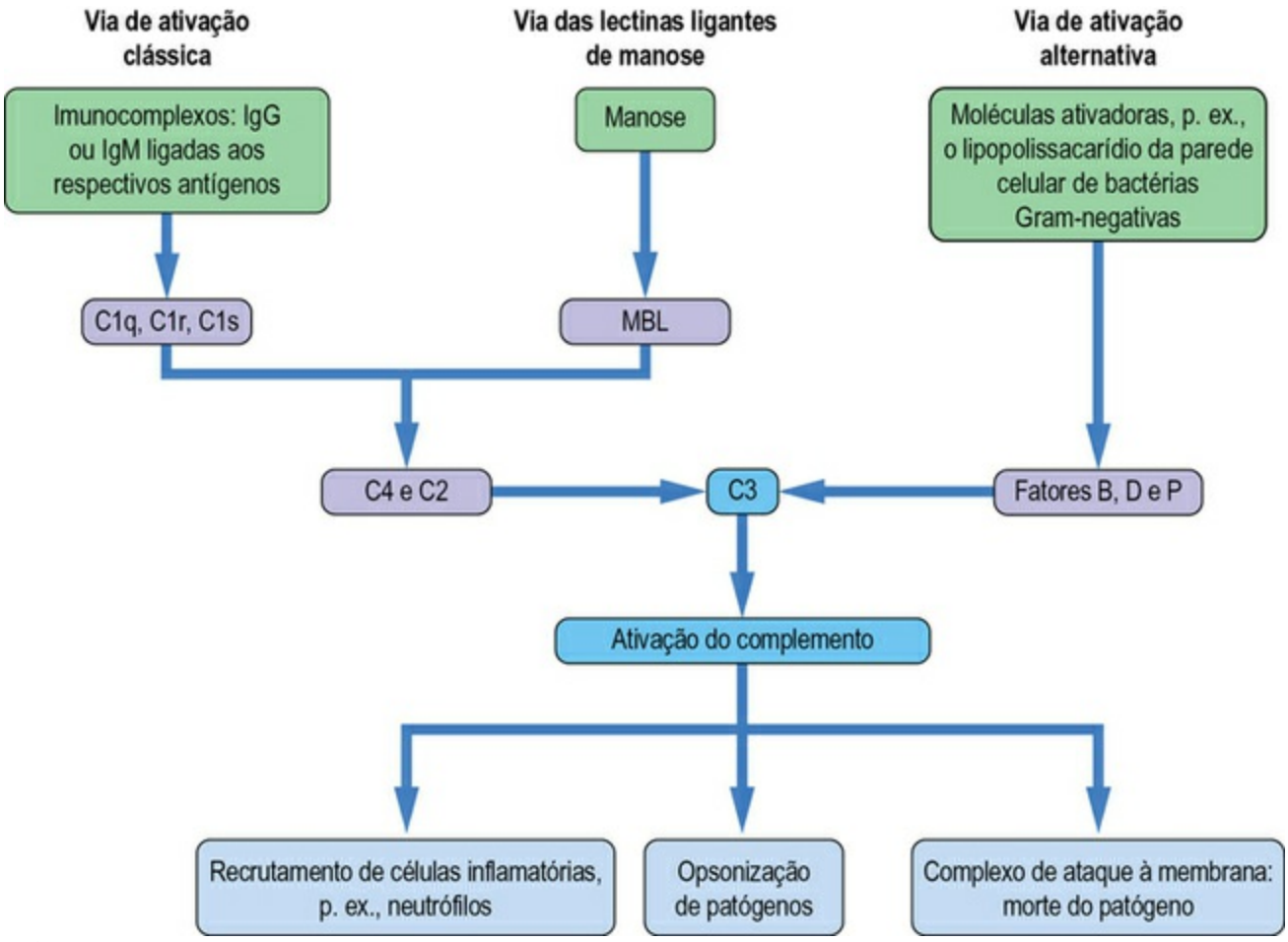


FIG. 38.1 A cascata do complemento.
Os estímulos ativadores incluem superfícies que desencadeiam a ativação do complemento e às quais o complemento ativado pode se ligar. A ativação do complemento recruta células inatas durante a fase inicial de uma resposta imune. A macromolécula polimérica final (o complexo de ataque à membrana) pode se inserir na superfície ativadora (a parede celular, no caso das bactérias), quebrando sua integridade e causando lise osmótica. MBL, lectina ligante da manose.

Citocinas

As citocinas são mediadores solúveis das respostas inflamatórias e imunes

As citocinas são produzidas por uma variedade de tipos celulares, incluindo aqueles das respostas imunes inata e adaptativa. Cobrindo um elevado número e diferentes famílias, as citocinas são pequenos peptídios ou glicoproteínas (geralmente, com menos de 20 kDa) ativos em concentrações entre 10^{-9} e 10^{-15} mol/L. Em geral, os macrófagos são frequentemente seus principais produtores durante as respostas inatas, e as células T durante as respostas adaptativas. No entanto, muitos tipos celulares, incluindo todas as células do sistema imune, bem como outras, como fibroblastos, células epiteliais e adipócitos, podem secretar citocinas. Interagindo com receptores específicos nas superfícies de suas células-alvo, o elevado número de citocinas atualmente identificado exibe muitos efeitos. A maioria atua localmente em sua região de produção (ação parácrina) ou nas próprias células que as produziram (ação autócrina). Poucas, no entanto, são capazes de agir em células mais distantes de seus locais de produção (ação endócrina). A rede de citocinas exibe tanto redundância quanto pleiotropia, muitas apresentando efeitos superpostos e uma capacidade de atuação em numerosos tipos

celulares. As citocinas foram agrupadas em subfamílias menores, com base em sua estrutura e função, como discutido sucintamente a seguir. Os receptores de citocinas não estão restritos às células do sistema imune, sendo encontrados amplamente distribuídos em diversos tipos celulares. Para mais detalhes sobre a sinalização das citocinas, ver o Capítulo 40.

As citocinas podem ser classificadas em famílias pelo seu efeito principal:

- **Fatores estimuladores de formação de colônias:** como o nome sugere, estes estão envolvidos no desenvolvimento e diferenciação de células imunes a partir de precursores da medula óssea.
- **Interferons (IFNs):** enquanto o IFN-α e o IFN-β têm um papel na inibição da replicação viral, o IFN-γ regula as respostas imunes. O último é produzido primariamente pelas células T e ativa os macrófagos.
- **Interleucinas (ILs):** atualmente, há mais de 30 interleucinas reconhecidas, participando na regulação tanto da resposta imune inata quanto da adaptativa. Elas são produzidas por vários tipos de células imunes (e outras). Como o nome indica, o principal modo de ação é a comunicação entre leucócitos.
- **Família do fator de necrose tumoral (TNF):** essa é uma coleção mista de citocinas, cujos efeitos variam desde a promoção da inflamação (TNF-α e TNF-β) ao estímulo dos osteoclastos e da reabsorção óssea (osteoprotegerina [OPG]).
- **Quimiocinas:** essa é uma família de citocinas que ocasiona a quimiocinese — o movimento em resposta aos estímulos químicos. O interesse sobre os receptores para estes mediadores aumentou significativamente, uma vez que alguns parecem atuar como correceptores para a infecção (em particular na infecção dos linfócitos T $CD4^+$ pelo HIV).

Anteriormente, era usual descrever as citocinas como pró- ou anti-inflamatórias. É agora claro que isso pode gerar confusão, dados os seus efeitos pleiotrópicos. A comparação da produção de citocinas nas respostas inata e adaptativa, e suas células de origem, pode agora ser considerada.

- **Durante as respostas inatas,** os macrófagos, as células dendríticas e as células *natural killer* (NK) são os maiores produtores de: TNF-α, IL-1, IL-6, IL-8 e muitas quimiocinas, IL-12, IL-15 e IL-18, IFN-γ (células NK). Estas podem ser todas consideradas como importantes comunicadores intercelulares, induzindo respostas inflamatórias e imunes.
- **Se uma resposta adaptativa ou mediada por células se desenvolve,** as células T, especialmente as células T $CD4^+$, tornam-se as produtoras principais de citocinas. Seus efeitos geralmente promovem ou controlam respostas adicionais e incluem a IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17, IL-22 e TGF-β.

O sistema complemento

O sistema complemento é ativado em uma série de passos sequenciais

O sistema complemento, que consiste em uma série de proteínas – quer circulantes, quer ligadas a membranas celulares –, desempenha um papel importante na defesa

antimicrobiana do hospedeiro. Existem três vias de ativação do complemento. Como parte da resposta inata, e na ausência de anticorpos, as vias **alternativa** e das **lectinas** ativam o complemento durante a infecção. Por exemplo, o reconhecimento do lipopolissacarídio presente nas paredes celulares das bactérias Gram-negativas desencadeará a via alternativa, e a manose e outros carboidratos particulares encontrados na parede celular de fungos, bactérias e vírus deflagrarão a via das lectinas. Além disso, os anticorpos produzidos durante a resposta adaptativa à infecção podem se ligar aos antígenos microbianos e ativar o complemento pela **via clássica.** A ativação sequencial da cascata por clivagem proteolítica resulta em uma resposta autoamplificadora, produzindo várias moléculas efetoras envolvidas na eliminação da infecção microbiana, como mostrado na Figura 38.1. As diferentes vias convergem na produção de um resultado comum, pelo qual os componentes mais tardios se combinam uns com os outros para formar um complexo multimolecular que pode quebrar a integridade da superfície de organismos infectantes, por inserção em sua membrana (o **complexo de ataque à membrana** [MAC]). Os fragmentos produzidos como resultado da cascata do complemento têm diferentes atividades biológicas, que incluem a facilitação da fagocitose (denominada **opsonização**), a atração de células **(quimiotaxia)** e o estímulo da desgranulação de células imunes (atividade de **anafilatoxina**).

Células participantes na resposta inata

Os neutrófilos e os monócitos são recrutados para os locais de infecção

Os neutrófilos e os monócitos, que são normalmente encontrados em circulação na corrente sanguínea, são recrutados para os locais da infecção pelo processo de extravasamento. Pela interação de receptores no fagócito e seus ligantes no endotélio vascular, as células se ligam, aderem e se movem da circulação para o tecido infectado. Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes na corrente sanguínea, com 4.000-10.000/mm^3. Este número aumenta rapidamente durante a infecção mediante recrutamento a partir da medula óssea e alcança frequentemente os 20.000/mm^3. Os neutrófilos são, em geral, as primeiras células a responder à infecção, fagocitando microrganismos na circulação e movendo-se rapidamente para o tecido infectado. Eles têm vida curta (normalmente de algumas horas a dias) e morrem rapidamente depois de chegarem ao tecido e exercerem seu efeito pelo processo de apoptose (Cap. 42).

Os monócitos se transformam em macrófagos, as "latas de lixo da resposta imune"

Os monócitos são encontrados em números muito menores no sangue, 500-1.000/mm^3 e, em oposição aos neutrófilos, são mais longevos. Da mesma forma que os neutrófilos, eles podem também migrar para os tecidos e, ao fazê-lo, eles se diferenciam em macrófagos. Os macrófagos têm várias funções-chave, incluindo a fagocitose dos microrganismos infectantes, a apresentação antigênica e a remoção geral de células hospedeiras mortas ou danificadas. De fato, os macrófagos são usualmente chamados de "latas de lixo da resposta imune". A maior parte dos órgãos corporais e do tecido conjuntivo possuem

macrófagos residentes, cuja função é vigiar o ambiente para sinais de infecção. Sua rápida capacidade de identificação da infecção, com a resultante liberação de numerosas citocinas e quimiocinas, inicia a resposta inflamatória.

Os neutrófilos e os macrófagos reconhecem os microrganismos que atacam o organismo por meio de seus receptores

No sentido de montarem uma resposta eficiente para a infecção, neutrófilos e macrófagos devem perceber que o organismo está sob ataque. Eles o fazem por meio de vários **receptores de superfície celular e intracelulares codificados na linha germinativa,** que, ao contrário dos receptores usados por células da resposta imune adaptativa, não são produzidos por recombinação somática de seus genes (Tabela 38.2). Em resultado, a resposta desencadeada por tais receptores é amnésica, o que significa que as células responderão similarmente na reinfecção. Os receptores envolvidos no reconhecimento microbiano, frequentemente denominados **receptores de reconhecimento de padrões (PRR),** identificam estruturas que são comuns a diversos microrganismos e que geralmente não estão presentes nas células do hospedeiro, como ácidos nucleicos, lipídios, açúcares, proteínas ou uma combinação de moléculas. Muitas vezes, as estruturas reconhecidas por esses receptores, chamadas padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), são características estruturais necessárias ao patógeno para sua sobrevivência ou infectividade e são geralmente comuns a famílias microbianas particulares.

Tabela 38.2

Comparação dos receptores antigênicos da imunidade inata e adaptativa

Característica do receptor	Imunidade inata	Imunidade adaptativa
Desencadeia uma resposta imediata	Sim	Não
Receptores codificados na linha germinativa	Sim	Não
Mesma especificidade ao longo da linhagem	Sim	Não
Largo espectro de reconhecimento	Sim	Não
Codificado por múltiplos segmentos genéticos	Não	Sim
Ocorre rearranjo gênico	Não	Sim
Cada receptor tem especificidade única	Não	Sim

Existem quatro categorias principais de receptores de reconhecimento de padrões, classificadas de acordo com a localização e a função

A primeira é a lectina ligante de manose (MBL) que, na realidade, não é uma molécula associada à célula, mas sim uma proteína plasmática circulante livre, a qual, ao reconhecer e se ligar ao PAMP do patógeno, pode ativar a cascata do complemento por intermédio da via das lectinas (Fig. 38.1). As restantes são receptores ligados à superfície que promovem a função fagocítica da célula, ou receptores de sinalização ligados à

membrana, encontrados na membrana celular externa ou no citoplasma.

Os receptores são usados pelos neutrófilos e macrófagos para promover a fagocitose

Os microrganismos podem ser revestidos por mediadores solúveis da resposta imune, como componentes do complemento ou anticorpos, em um processo designado **opsonização.** Ele torna o processo fagocítico de captação dos microrganismos pelos neutrófilos e macrófagos mais eficiente. Os receptores de superfície usados pelos neutrófilos e macrófagos para promover a fagocitose e a morte dos microrganismos incluem os receptores de manose e *scavenger* (receptores que reconhecem LDL), receptores do complemento e receptores Fc. Os receptores de manose e *scavenger* permitem o reconhecimento direto do microrganismo por fagócitos, enquanto os receptores do complemento e os receptores Fc, que reconhecem e opsonizam o microrganismo revestido com componentes do complemento e anticorpos, respectivamente, também acentuarão a atividade fagocítica (Fig. 38.2).

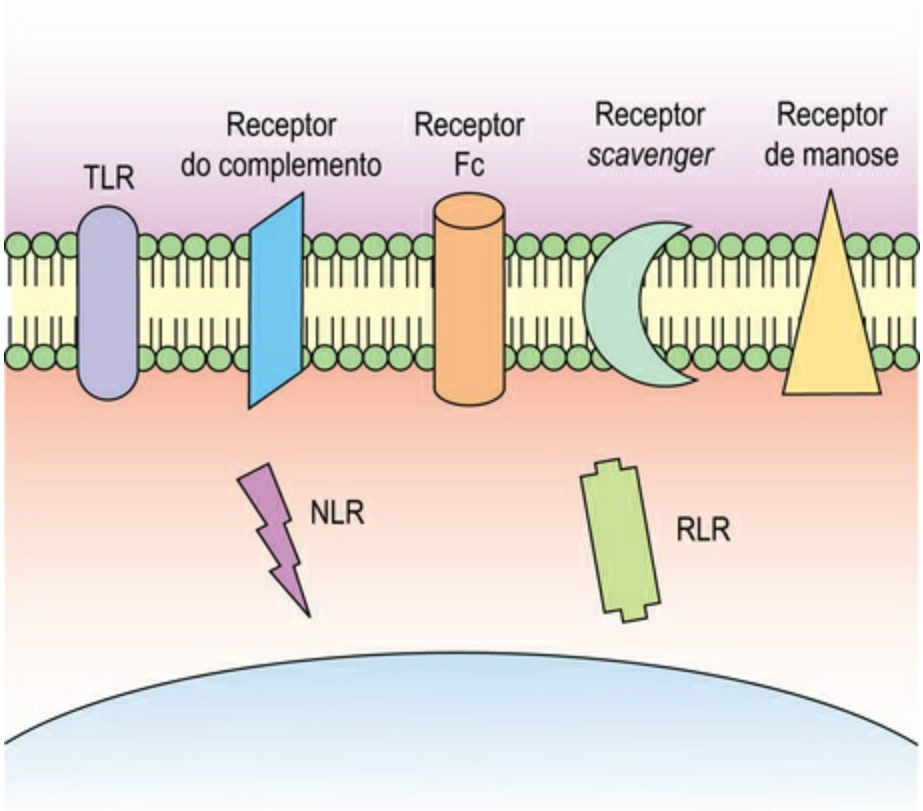


FIG. 38.2 Os fagócitos utilizam numerosos receptores para detectar patógenos.
As células do sistema imune inato expressam numerosos tipos de receptores, tanto à superfície da membrana quanto intracelularmente, para detectar patógenos e iniciar uma resposta imune eficiente. TLR, receptor semelhante ao Toll; NLR, receptor semelhante ao NOD; RLR, receptor semelhante ao RIG-1.

Os receptores de sinalização são usados por células do sistema imune inato para desencadear muitas de suas funções

Uma das famílias de PRR de sinalização mais bem caracterizada é o "receptor semelhante

ao Toll" (TLR), sistema evolutivamente conservado em mamíferos, designado em função de um sistema receptor homólogo usado pela *Drosophila*, a mosca da fruta, para proteção contra a infecção. No homem, há 10 genes TLR expressos (13 em ratos), e seus produtos formam homo- ou heterodímeros com outros membros da família, aumentando assim o repertório para o reconhecimento. Demonstrou-se que o TLR4, por exemplo, é o receptor que reconhece o lipopolissacarídio (LPS) encontrado na superfície das bactérias Gram-negativas, como a *E. coli*, mas ausente em células mamíferas. Os efeitos da ativação dos TLR podem variar dependendo da necessidade e podem incluir produção aumentada de citocinas/quimiocinas, fagocitose acentuada, regulação positiva de moléculas coestimuladoras na superfície celular, migração celular e, se apropriados, o processamento e apresentação de antígenos patogênicos às células T, de forma que ativem uma resposta imune adaptativa. A Tabela 38.3 resume as funções e distribuições celulares dos TLRs. Os TLRs podem ser expressos na membrana celular externa ou em vesículas intracelulares e funcionam primariamente no reconhecimento de patógenos extracelulares. Enquanto certos TLRs intracelulares (TLR3/7/9) podem detectar RNAs e DNAs virais, eles interagem primariamente com os produtos patogênicos extracelulares que entram pela via endocítica.

Tabela 38.3

Ligantes e distribuição celular dos receptores semelhantes ao Toll (TLR)

TLR	Expressão celular	Ligantes	Espécies patogênicas
Heterodímero TLR1-TLR2	Monócitos, CDs	Zimosina	Fungos
Heterodímero TLR2-TLR6	Células NK Eosinófilos Basófilos	Lipoproteínas Ácido lipoteicoico β-glicanos Lipomananos	Bactérias Bactérias Gram (+vas) Bactérias e fungos Micobactérias
TLR3	Células NK	RNA de cadeia dupla	Vírus
TLR4	Macrófagos, CDs, eosinófilos, mastócitos	LPS	Bactérias Gram (-vas)
TLR5	Epitélio intestinal	Flagelina	Bactérias
TLR7	CDs, células NK, eosinófilos, células B	RNA de cadeia simples	Vírus
TLR8	Células NK	RNA de cadeia simples	Vírus
TLR9	CDs, células NK, eosinófilos, células B, basófilos	CpG não metiladas (DNA)	Bactérias
TLR10	CDs, células NK, eosinófilos, células B	Desconhecidos	Bactérias

CDs, células dendríticas, o tipo principal de células apresentadoras de antígenos; LPS, lipopolissacarídio; CpG, dinucleotídio citosina-guanina; NK, células "natural killer".

Os receptores semelhantes ao NOD estão localizados no citoplasma

Outros receptores de reconhecimento de padrões, incluindo os **receptores semelhantes ao NOD** (NLR), mais recentemente descritos, estão localizados no **citoplasma.** Atuam como sensores intracelulares, desencadeando, em última instância, a via do NFκB, que

resulta em respostas similares às ativadas mediante ativação dos TLRs. Em presença de certos estímulos patogênicos invasores (bacterianos, fúngicos ou virais), os TLRs e os NLRs cooperam, ativando um complexo multiproteico citoplasmático denominado **inflamassoma.** A consequente ativação da caspase-1 conduz ao processamento e à liberação de formas maduras de citocinas pró-inflamatórias, incluindo a IL-1 e a IL-18.

Uma última família de PRRs de sinalização intracelulares – os receptores semelhantes ao RIG-1 (RLR) – detecta RNAs virais e estimula respostas antivirais mediante a produção de interferon (Fig. 38.2).

A ativação de PRRs, como o TLR/NLR, não só induz respostas inatas eficientes para fazer frente às infecções microbianas, como também induz respostas que, por sua vez, levam à ativação completa da resposta imune adaptativa.

Resposta imune adaptativa

A especificidade da resposta é obtida por meio de receptores que reconhecem o antígeno

As respostas imunes adaptativas são chamadas à ação se nossas defesas inatas não forem bem-sucedidas, por exemplo, devido à persistência do agente desencadeador. A resposta é iniciada quando os linfócitos reconhecem componentes do agente infeccioso. Os agentes infecciosos são chamados **antígenos** e **sua ligação aos receptores nos linfócitos desencadeia uma resposta adaptativa.** Os receptores nas células B e T diferem e reconhecem formas antigênicas bastante diferentes.

A educação tímica e autotolerância auxiliam a distinção entre o próprio e o não próprio

A capacidade de diferenciação entre o próprio e o não próprio é crucial para que as respostas adaptativas sejam bem--sucedidas. O sistema imune realiza isso por meio dos processos de educação e autotolerância tímicos. Isso assegura que se desenvolvam as respostas imunes apropriadas às infecções. A falha desse processo e a ativação inapropriada da resposta imune por antígenos próprios pode ocasionar o desenvolvimento de **autoimunidade,** presente, por exemplo, como **artrite reumatoide** ou **lúpus eritematoso sistêmico**.

A resposta imune adaptativa requer tempo para se desenvolver e se recorda do que vê

Quando uma resposta imune adaptativa é iniciada pela primeira vez, relativamente poucos componentes são passíveis de estarem disponíveis para reagirem de modo específico com qualquer substância antigênica escolhida. Há um compasso temporal enquanto estes aumentam para um nível no qual possam garantir a eliminação do antígeno, ou pelo menos reduzi-lo para um nível que seja controlável pela resposta imune inata.

A resposta imune adaptativa emprega um mecanismo de recordação de um encontro

específico, de modo que, se o mesmo antígeno exógeno for novamente encontrado, ele poderá ser controlado de forma mais rápida e eficaz. Isso é chamado **memória imunológica.** Deste modo, em comparação com a imunidade inata, a resposta adaptativa exibe tanto especificidade quanto memória para o antígeno exógeno ou não próprio.

As células primariamente responsáveis pela resposta adaptativa são os linfócitos

A imunidade adaptativa é mediada, tal como a resposta inata, por elementos celulares e humorais. As células primariamente responsáveis são **os linfócitos.** Existem dois tipos principais de linfócitos circulando no sangue e presentes nos tecidos linfoides:

- As **células T,** que são responsáveis por várias respostas celulares.
- As **células B,** que são responsáveis pelas respostas humorais, ou seja, pela produção de anticorpos.

Além dos linfócitos, as **células apresentadoras profissionais de antígenos (APCs)** são necessárias para a eficiente ativação inicial dos linfócitos T.

Linfócitos T e B

Os linfócitos T e B são portadores de coleções particulares de marcadores de superfície celular que podem auxiliar a atribuição de sua linhagem

As células efetoras inicialmente envolvidas na resposta imune adaptativa são os linfócitos T e B. No total, os linfócitos estão presentes no sangue periférico em concentrações de 1,3-4,0 × 10^9/L. Destes, aproximadamente 50-70% são células T e 10-20% são células B.

Uma terceira população denominada **células *"natural killer"* (NK),** assim chamadas por demonstrarem a capacidade de matar células neoplásicas ou células infectadas por vírus sem contato prévio ou sensibilização, são linfócitos atípicos e geralmente considerados parte da resposta inata. A identificação das células T e B tem como base estudos imunofenotípicos ou funcionais. Elas possuem coleções particulares de marcadores de superfície celular que podem auxiliar na atribuição de suas linhagens. A distinção entre células T e B é feita mais facilmente pela referência a seus receptores antigênicos (Fig. 38.3).

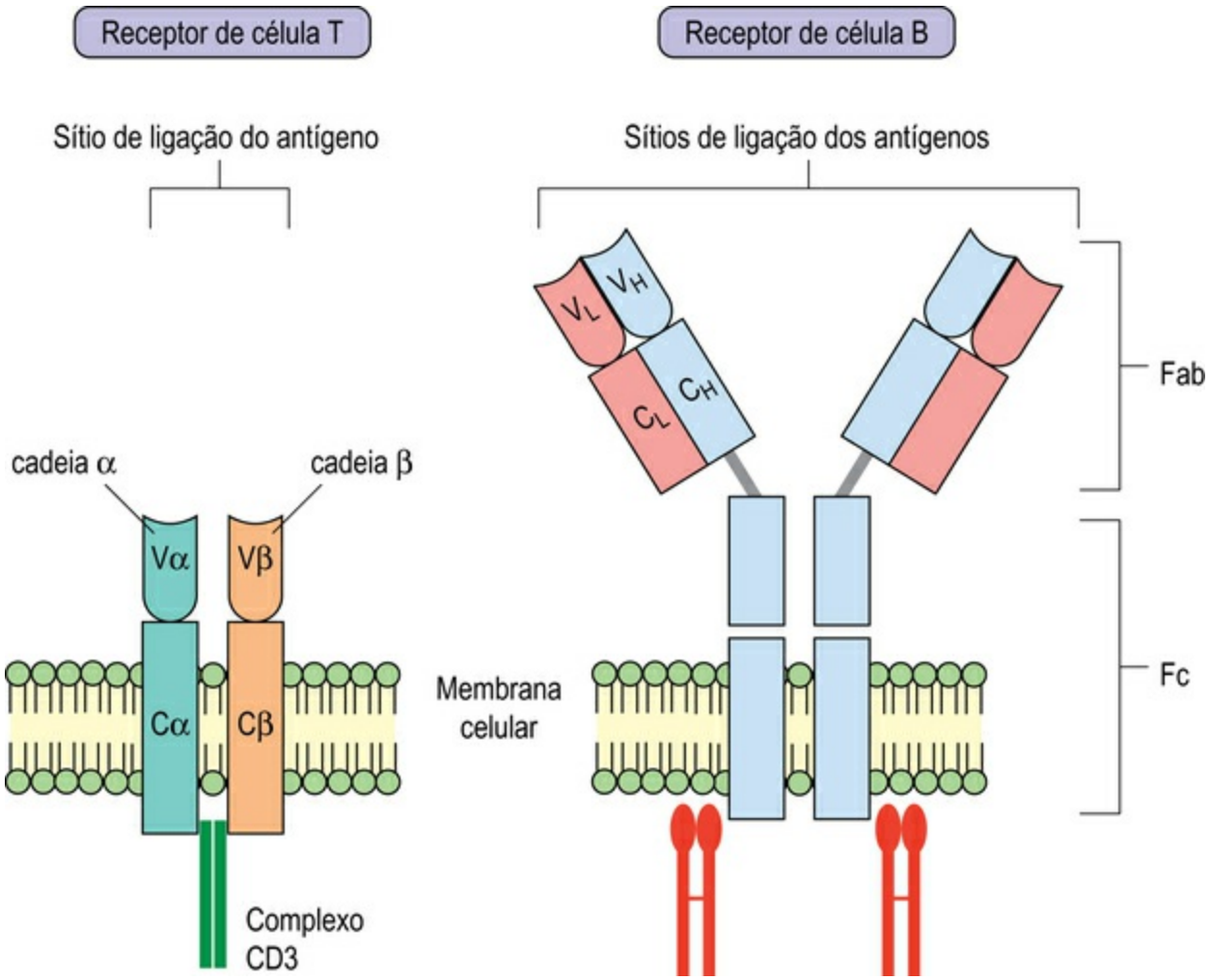


FIG. 38.3 Similaridade nas estruturas dos receptores antigênicos das células T e B. Os receptores usados pelas células T e pelas células B para detectar antígenos compartilham similaridade estrutural. V, regiões variáveis; C, regiões constantes.

Os marcadores de superfície nos linfócitos e em outras células imunes são classificados de acordo com seu **sistema de grupamento de diferenciação (CD),** com base nas características de ligação a anticorpos dessas moléculas.

Os linfócitos T e B são ativados pela ligação do antígeno e por moléculas coestimuladoras

O receptor de reconhecimento antigênico na célula B é uma **imunoglobulina de superfície** denominada "sIg". Ao se ligar a seu antígeno, ela ocasiona a ativação da célula e subsequentes proliferação e diferenciação. Além da sIg, as células B expressam vários outros marcadores, dos quais os mais bem caracterizados incluem o CD19, o CD20 e as **moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe II.**

O receptor antigênico da célula T é denominado receptor de células T (TCR) e forma um complexo com o CD3

Outros dois marcadores CD, cuja expressão parece ser mutuamente exclusiva nas células T, são o CD4 e o CD8, e são úteis na categorização adicional da função das células T.

As células NK são atualmente identificadas pela expressão da combinação de CD16 e CD56

Esses marcadores são frequentemente usados na tecnologia de citometria de fluxo, usando anticorpos monoclonais fluorescentes para identificar os tipos celulares.

Outro grupo de moléculas de superfície, as moléculas coestimuladoras, é encontrado na superfície das células T e B

Após exposição ao antígeno, o CD28 nas células T se ligará ao CD80/CD86 nas células APC, enquanto o CD40 nas células B se ligará ao CD40L nas células T, resultando em ativação máxima. Sem tal coestimulação, as células T e B não serão completamente ativadas após exposição ao antígeno e podem se tornar anérgicas, isto é, não responsivas.

Moléculas envolvidas no reconhecimento antigênico

O antígeno é reconhecido por receptores específicos nas células T e B

A capacidade de reconhecer o enorme número de configurações antigênicas possíveis é proporcionada por diferenças na sequência de aminoácidos destes receptores, o que origina diferenças em sua forma ou conformação. O antígeno e seu receptor específico têm uma relação "mão e luva". Os receptores antigênicos das células T e B exibem acentuada variabilidade na sequência de aminoácidos que entra em contato com o antígeno, enquanto outras partes dessas moléculas são relativamente constantes no que diz respeito a suas sequências de aminoácidos.

Ao contrário dos receptores antigênicos encontrados nas células inatas, os quais são codificados pela linhagem germinativa, os receptores encontrados nas células T e B são gerados por recombinação aleatória dos genes do receptor durante a maturação celular. Esses receptores de reconhecimento antigênico são distribuídos em clones diferentes. Como resultado, cada clone exibirá uma especificidade única para um antígeno particular, gerando desta forma um enorme conjunto de células capazes de responder a todos os antígenos.

Como mencionado anteriormente, as células T e B diferem naquilo que reconhecem como "exógeno". O receptor antigênico sIg encontrado nas células B é capaz de reconhecer macromoléculas (proteínas, polissacarídios, lipídios etc.), enquanto os receptores das células T reconhecem pequenos peptídios originados de proteínas previamente processadas pelas APC.

Embora o número de clones de células T e B – cada um reconhecendo antígenos diferentes – seja enorme, a ligação do antígeno apropriado geralmente induzirá uma resposta similar, isto é, a **transdução de sinal.** Isso pode levar à ativação celular plena, resultando, para as células B, na produção de anticorpos e, para as células T, na proliferação e promoção da resposta imune adaptativa.

O receptor antigênico da célula T

O receptor antigênico da célula T (TCR) se assemelha à porção ligante de uma molécula de imunoglobulina

O TCR é um heterodímero constituído por duas cadeias polipeptídicas diferentes, chamadas α e β (Fig. 38.3). Além disso, uma pequena população única de células T, encontrada primordialmente no intestino, expressa TCRs alternativos, com suas cadeias conhecidas como γ e δ. Cada cadeia do TCR é composta por dois domínios — uma sequência de aminoácidos **constante** e outra **variável.** O sítio de ligação antigênica do TCR se localiza na fenda formada pelos domínios variáveis *N*-terminais contíguos das cadeias α (Vα) ou β (Vβ). A função efetora do domínio constante em cada uma das cadeias do receptor antigênico é a transdução de sinal. As duas cadeias estabelecem contato próximo por meio de ligações covalentes entre os domínios variáveis e de interações hidrofóbicas não covalentes entre as faces opostas dos domínios constantes. Estruturalmente, o TCR se assemelha à porção de ligação de uma molécula de imunoglobulina – o receptor antigênico encontrado nas células B –, mas é bastante distinto, sendo o resultado de diferentes produtos gênicos.

Complexo principal de histocompatibilidade

O MHC é responsável pela maneira como as células T "veem" um antígeno em um contexto do próprio

Para uma resposta imune ser iniciada, o antígeno não pode simplesmente se ligar à célula T mais próxima, mas deve ser formalmente "apresentado" ao sistema imune. Isso ocorre quando as APC expressam peptídios antigênicos processados ligados aos sulcos das moléculas de MHC em suas superfícies celulares. As moléculas de MHC das classes I e II também providenciam um mecanismo diferencial de processamento de antígenos originados a partir de células, por exemplo, vírus, e aqueles provenientes do ambiente extracelular, por exemplo, muitos antígenos bacterianos. As diferentes moléculas de classes MHC conduzem tais antígenos por meio de diferentes vias para interagirem com o sistema imune, em particular com as células T, com base no fato de que cada um será melhor gerido por diferentes sistemas efetores: a classe I leva a respostas T $CD8^+$ citotóxicas, e a classe II instrui células T $CD4^+$ auxiliares para proporcionarem o auxílio apropriado às células B para uma resposta mediada por anticorpos.

O complexo de genes MHC se encontra agrupado em três regiões, denominadas classes I, II e III

O complexo gênico do MHC é encontrado no braço curto do cromossomo 6 e está agrupado em três regiões, conhecidas como classes I, II e III, sendo a mesma nomenclatura aplicada a seus respectivos produtos polipeptídicos (Fig. 38.4). A chave para o sucesso da resposta imune adaptativa é a **natureza poligênica e polimórfica do MHC.** Com isto, pretendemos dizer que existem diferentes genes de MHC classes I e II e que, para qualquer um, múltiplas variantes ou alelos podem ser expressos. As moléculas de classes I e II estão diretamente envolvidas no reconhecimento imune e em interações celulares, enquanto as moléculas de classe III estão envolvidas na resposta inflamatória pela codificação de mediadores solúveis, incluindo componentes do complemento da

resposta inata e o TNF.

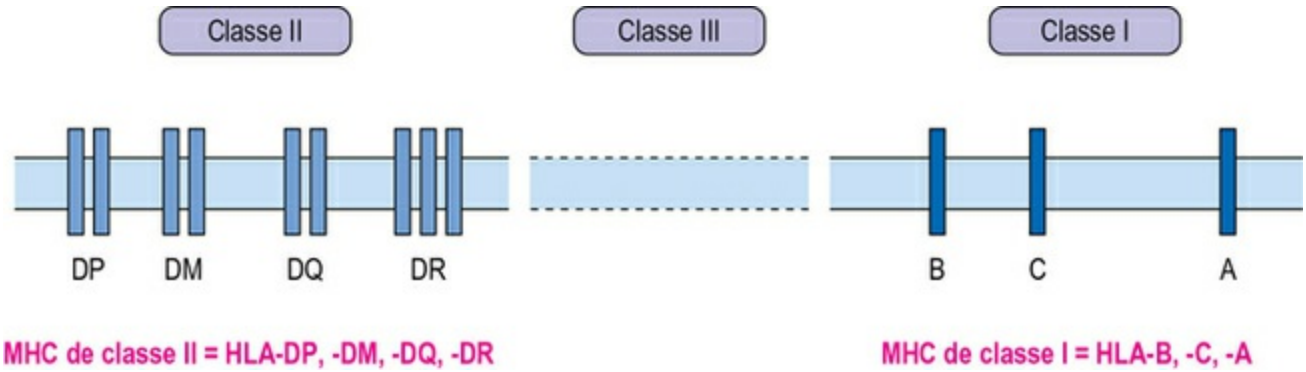


FIG. 38.4 Organização genética do MHC e dos produtos expressos.
Os genes do MHC em humanos estão localizados no cromossomo 6. Os produtos gênicos são os antígenos leucocitários humanos (HLA).

Os genes do MHC de classe I estão organizados em vários *loci*, sendo os mais importantes conhecidos como HLA-A, HLA-B e HLA-C

Os alelos do MHC são transmitidos e expressos de forma mendeliana codominante. Devido à sua proximidade no cromossomo, eles são herdados em bloco como partes de um haplótipo e são expressos na superfície de todas as células nucleadas. As cadeias α que eles codificam têm três domínios, um dos quais é estruturalmente semelhante àquele encontrado nas moléculas de imunoglobulina, mas os outros dois apresentam diferenças significativas. As cadeias α se combinam com a β2-microglobulina para dar origem a uma molécula funcional de classe I (Fig. 38.5).

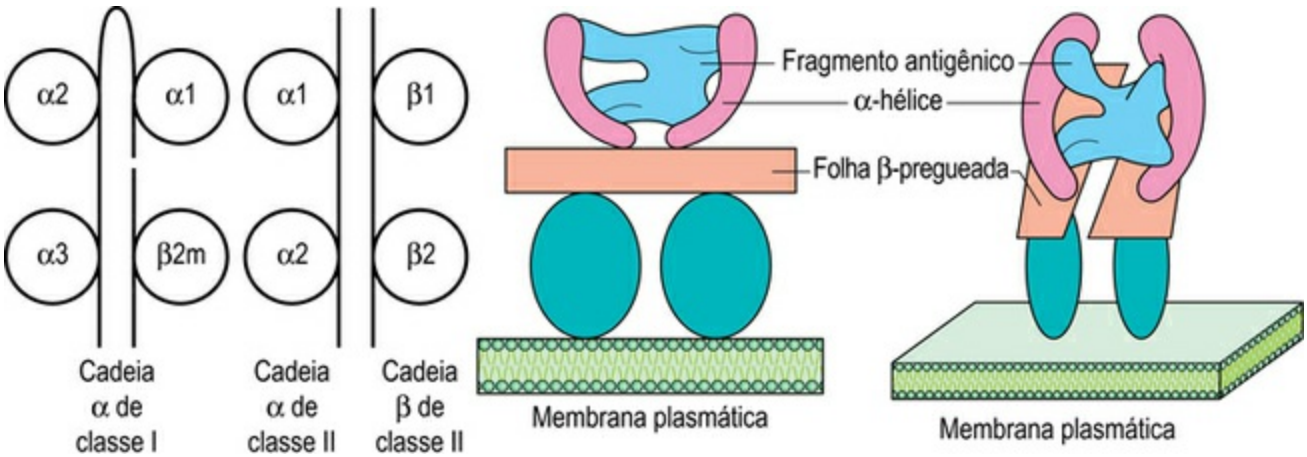


FIG. 38.5 Estrutura dos MHC (HLA) de classes I e II.
À esquerda, estão as moléculas MHC de classe I e classe II. Nas moléculas de classe I, a β2-microglobulina (β2m) fornece o quarto domínio. À direita, a conformação proteica e o enrolamento das moléculas de MHC dão forma ao sulco de ligação dos peptídios antigênicos.

Os genes de classe II são HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DM e HLA-DP

Os genes da sub-região de classe II, conhecidos como HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DM e HLA-DP, são organizados em *loci* α e β, dando origem às cadeias polipeptídicas α e β,

respectivamente. Ambas têm aproximadamente o mesmo peso molecular e se combinam para formar um heterodímero com estrutura terciária similar a uma molécula de classe I, com um sulco peptídico no qual o fragmento antigênico processado é inserido durante a apresentação antigênica (Fig. 38.5). Ao contrário da expressão das moléculas de classe I, as moléculas de classe II são mais restritas, sendo expressas principalmente nas APC profissionais, como as células dendríticas, assim como nos macrófagos e linfócitos B.

Diversas variantes alélicas (atualmente mais de 1.000) podem ser identificadas em cada um dos *loci* associados à apresentação antigênica. Existem seis *loci* principais, cada um possuindo entre 10 e 60 alelos funcionais reconhecíveis, e, como cada progenitor passa adiante um conjunto ou haplótipo em cada cromossomo, é fácil compreender que a probabilidade de um outro indivíduo da mesma espécie apresentar o mesmo conjunto é remota.

O receptor antigênico da célula B

O receptor antigênico da célula B (BCR) é uma forma membranar das moléculas de imunoglobulina encontradas em circulação no soro

As imunoglobulinas são moléculas em forma de "Y" constituídas por quatro cadeias polipeptídicas (Cap. 4) (Fig. 4.5) – um par de cadeias pesadas, cada uma com peso molecular aproximado de 150 kDa, e um par de cadeias leves, cada uma com aproximadamente 23 kDa. Os braços interagem com o antígeno, e sua estrutura tem como base os domínios imunoglobulínicos, com sequências constantes e variáveis de aminoácidos, tanto nas cadeias pesadas quanto nas leves. É o domínio amino-terminal, de sequência variável, tanto da cadeia pesada quanto da leve, que forma uma bolsa que constitui o sítio de ligação antigênica; a porção de "ligação dos fragmentos antigênicos" **(Fab)** se localiza na extremidade dos braços (Fig. 4.5). Os domínios restantes das cadeias de sequência de aminoácidos relativamente constantes são chamados **constante pesado (C_H)** e **constante leve (C_L)** e formam o tronco **(porção Fc),** que tem várias funções, incluindo a ligação de componentes do complemento e a ligação aos receptores Fc em vários leucócitos, incluindo macrófagos, células NK, neutrófilos, mastócitos e células B.

Existe uma gama quase infinita de possibilidades para as especificidades dos anticorpos

O repertório de receptores, que muito provavelmente tem mais de 10^{11} especificidades diferentes, ocorre como resultado do processo mediante o qual os vários genes estão envolvidos na combinação da molécula. A região variável de uma cadeia leve é o produto de dois genes diferentes (V = variável e J = junção). Isso, por sua vez, se combina com o produto gênico da região constante, originando a cadeia proteica leve completamente transcrita e traduzida. Para a cadeia pesada, o grau de complexidade é aumentado com a adição do produto gênico D (diversidade), formando parte da área variável, além dos segmentos gênicos V e J. Novamente, estes se combinam com os segmentos da região C, mas, para as cadeias pesadas, múltiplos produtos de genes C constituem a proteína

completa. Múltiplas cópias de cada um dos segmentos gênicos no DNA da linhagem germinativa, que são, por sua vez, usados aleatoriamente, assim como a possibilidade de polimorfismos nos indivíduos, resultam na quase infinita gama de possibilidades para as especificidades dos anticorpos. As células B maduras têm a capacidade de acumular pequenas mutações pontuais no DNA codificante das cadeias pesadas e leves da imunoglobulina, designadas **hipermutações somáticas,** que conferem variação adicional à especificidade do processo de reconhecimento.

Tecidos linfoides

Tecidos linfoides primários (centrais)

Os linfócitos, provenientes de células-tronco hematopoiéticas comuns derivadas da medula óssea, são encontrados inicialmente em tecidos linfoides primários, onde sofrem desenvolvimento inicial e diferenciação.

A maturação da maioria das células B ocorre na medula óssea

Inicialmente, as células B progenitoras rearranjam seus genes imunoglobulínicos. Elas o fazem em um processo independente de antígenos, interagindo com as células do estroma da medula óssea. As células B imaturas resultantes expressam **IgM de superfície** como receptor antigênico. Se elas interagirem de forma demasiadamente forte com antígenos ambientais nesse estágio, são removidas pelo processo de seleção negativa, limitando, desta forma, a hipótese de autorreatividade. Após a saída para a periferia, as células B expressarão tanto **IgM quanto IgD de superfície** e podem ser ativadas pela ligação ao antígeno. Essas células irão se multiplicar; algumas irão se transformar em plasmócitos secretores de anticorpos, enquanto outras, em células de memória, mais longevas.

Os progenitores dos linfócitos T migram para o timo, onde se desenvolvem em linfócitos T

O timo é uma estrutura multilobada encontrada na linha média do corpo, mesmo acima do coração. Ao nível macroscópico, existe uma área cortical externa e uma área medular interna em cada lóbulo. O desenvolvimento das células T progride no timo, à medida que as células T imaturas migram do córtex para a medula. As células T imaturas interagem com o epitélio tímico e com as células dendríticas. Essas células são consideradas responsáveis por processos de seleção positiva e negativa que ocorrem como parte da "educação tímica das células T". Durante esses processos, as células T são avaliadas pela sua capacidade de interagirem com o MHC "próprio" e, se for apropriado, recebem sinais de sobrevivência. As células que exibem excessiva reatividade ao MHC recebem sinais que levam à sua deleção enquanto ainda se encontram no timo. Isso remove as células **autorreativas,** as quais, se liberadas para a periferia, poderiam potencialmente induzir autoimunidade. O desenvolvimento das células B e T jovens nos tecidos linfoides primários é independente de estimulação antigênica extrínseca.

Tecidos linfoides secundários (periféricos)

Os tecidos linfoides secundários englobam os linfonodos, o baço e os tecidos linfoides associados às mucosas (MALT)

Estes tecidos são funcionalmente organizados por todo o organismo e têm em comum um grau de compartimentalização, com áreas específicas para as células T e B, e áreas de superposição onde elas interagem e respondem ao antígeno. É nestes locais que as reações imunes efetivamente se desenvolvem. Por exemplo, ao saírem do timo, as células T "virgens" recircularão pela corrente sanguínea e entrarão nos linfonodos pelo aumento da expressão de moléculas de adesão e de receptores de quimiocinas, que permitem que elas se localizem nas áreas dos linfócitos T do tecido.

No linfonodo, a região das células T é o paracórtex e a região das células B são as áreas foliculares da medula

Aqui, podem ser encontradas estruturas de dois tipos: o folículo primário não estimulado e os folículos secundários estimulados, caracterizados pela presença dos centros germinativos. **A linfa, que drena dos tecidos para os linfonodos, transportará antígenos que, por sua vez, serão colhidos pelas APC para apresentação aos linfócitos.** Além disso, as APC periféricas que tiverem encontrado o patógeno terão migrado para o seu linfonodo drenante mais próximo, processando o antígeno pelo caminho e esperando ativar a célula T com especificidade adequada. Quando ativadas, as células T alterarão novamente a expressão dos receptores de quimiocinas e deixarão o linfonodo para recircularem para o sítio de infecção, onde podem induzir uma resposta efetora.

O baço contém tecido não linfoide (a polpa vermelha), assim como áreas linfoides, a polpa branca

Na polpa branca, as áreas foliculares de células B são evidentes, e as regiões de células T se localizam entre elas no espaço interfolicular. O baço é usado pela resposta imune para a apresentação de antígenos originados no sangue.

Os MALT compreendem os elementos linfoides adjacentes às superfícies mucosas

Eles são encontrados na entrada do trato respiratório e no intestino, e incluem as amígdalas e adenoides. Mais abaixo no trato digestivo, são encontrados agregados não encapsulados de células linfoides, conhecidos como placas de Peyer, superpostos por áreas de epitélio especializadas no escrutínio do ambiente antigênico. De maneira semelhante aos linfonodos e ao baço, estes tecidos são importantes para **seleção e apresentação inicial dos antígenos,** em particular dos antígenos que entram no corpo por meio de uma falha do epitélio ou pelo intestino.

Células apresentadoras de antígenos

As APC são células especializadas que apresentam antígenos microbianos em sua

superfície para permitir a ativação das células T

As **células dendríticas** são as principais APC e são encontradas por todo o organismo. A pele e os diferentes órgãos têm suas populações residentes dessas células. As células dendríticas podem migrar por todo o organismo, do tecido para a circulação e, pelo caminho, podem entrar nos órgãos linfoides secundários especializados, como os linfonodos (onde elas podem ativar linfócitos para uma resposta adaptativa). Após captura do antígeno, as APC podem processá-lo e reexpressá-lo, no contexto de MHC, à superfície celular, para permitir a **apresentação às células T.** As células dendríticas são designadas como "APC profissionais", uma vez que, além de serem capazes de apresentar o antígeno, também possuem várias outras moléculas de superfície, por exemplo, CD80/86, que fornecem os sinais adicionais, a chamada "coestimulação". Esses sinais são necessários para a completa ativação dos linfócitos T "virgens". Além disso, eles poderão liberar determinadas citocinas, por exemplo, IL-12, que irão influenciar a ativação e a diferenciação das células T. Outras células, que também são capazes de apresentar antígenos e, portanto, são consideradas APC, incluem macrófagos e células B.

Moléculas de adesão

As moléculas de adesão medeiam a adesão entre as células

As interações celulares diretas que ocorrem durante uma resposta imune são dependentes da expressão de moléculas e ligantes que medeiam a adesão entre as células ou entre as células e a matriz extracelular. Estas são chamadas "moléculas de adesão". Elas são encontradas em uma ampla variedade de tipos celulares, não apenas nas células do sistema imune, mas também, por exemplo, no endotélio vascular (Cap. 18). O principal determinante de sua expressão é o ambiente predominante de citocinas e a matriz de tecido conjuntivo circundante. Tipicamente, são **glicoproteínas transmembranares.** Elas entregam sinais intracelulares e, durante as respostas imunes, são principalmente envolvidas na promoção das interações célula-célula e da migração celular. A migração inclui o movimento das células inatas do sangue para os tecidos durante a infecção, bem como o auxílio a linfócitos para entrar e sair dos linfonodos, à medida que circulam pelo corpo buscando sinais de ativação resultantes de apresentação antigênica nesses órgãos periféricos. As moléculas de adesão envolvidas na imunidade são agrupadas em três famílias principais:

- **Integrinas.** Estas são proteínas heterodiméricas expressas nos leucócitos, como o antígeno associado à função do linfócito 1 (LFA-1) ou a molécula de adesão do macrófago 1 (MAC-1).
- **Moléculas de adesão da família dos supergenes das imunoglobulinas.** Estas são frequentemente expressas nas células endoteliais, por exemplo, a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1; CD54) ou a molécula de adesão plaquetária/celular 1 (PECAM-1; CD31).
- **Selectinas.** Elas são expressas em leucócitos e células endoteliais, por exemplo, a L-selectina ou a P-selectina.

- **Adressinas vasculares semelhantes à mucina.** Estas são frequentemente encontradas nos leucócitos e no endotélio. Ligam selectinas.

Reação, resposta e eliminação dos antígenos

Após ligação ao antígeno, a célula se diferencia em uma progênie com uma função efetora ou uma função de memória

Ao se ligar com sucesso aos antígenos, o linfócito ativado sofre repetida divisão ou proliferação. Segue-se a diferenciação, que pode levar ao desenvolvimento de uma **função efetora** ou à geração de **memória.**

A seleção clonal cria clones de células idênticas com uma especificidade antigênica única

A seleção clonal é o processo pelo qual a resposta imune cria clones de células idênticas, cada clone tendo uma especificidade antigênica única. Com esse repertório clonal, o antígeno determina qual linfócito específico será ativado. O processo de drenagem antigênica e de recirculação linfocitária para os tecidos linfoides periféricos assegura que o **antígeno seja inspecionado por muitos linfócitos** e possa selecionar para proliferação e diferenciação a célula que possui um **receptor antigênico específico e recíproco.** A seleção clonal garante não só um número adequado de células efetoras para lidar com a ameaça no momento da estimulação inicial, mas também permite que um número conveniente de células de memória "semiativadas" se torne capaz de completar sua ativação mais rapidamente na exposição antigênica subsequente. A Figura 38.6 apresenta os eventos para as células B, mas as células T também sofrem um processo similar, resultando em clones proliferativos de células efetoras ativadas e em células de memória produzidas para respostas subsequentes.

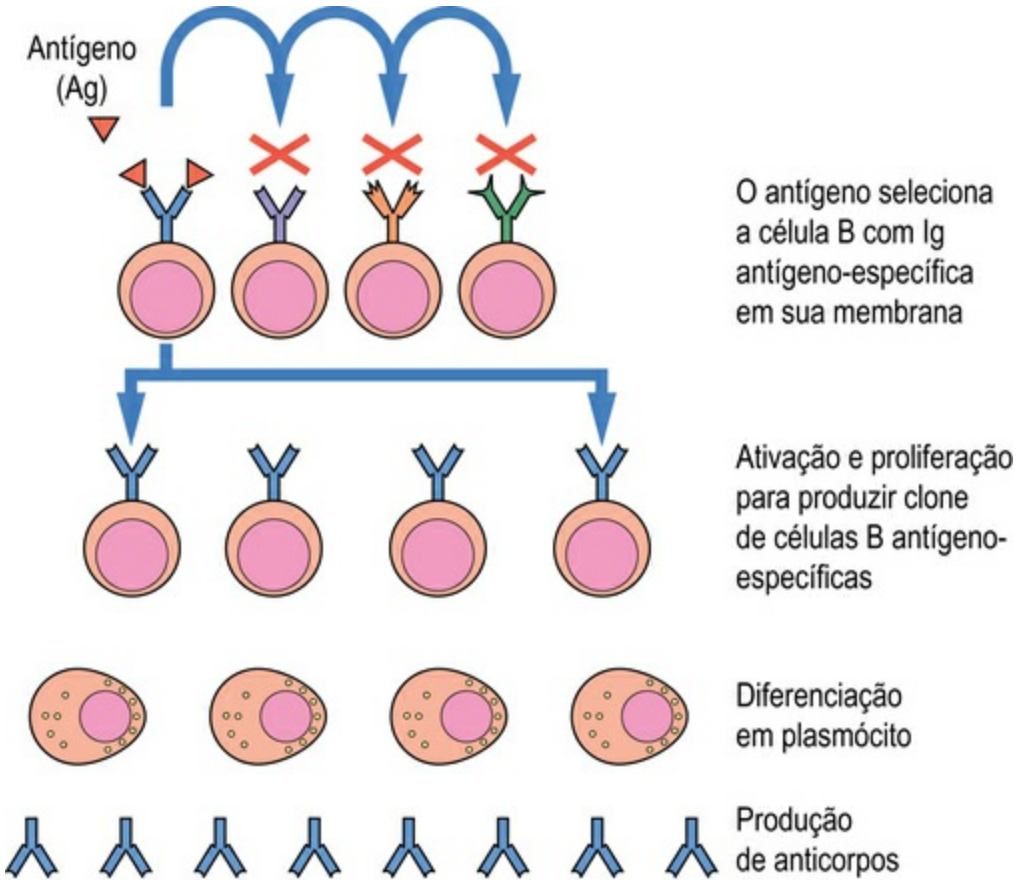


FIG. 38.6 Seleção clonal em células B.
A imunoglobulina de superfície (sIg) antígeno-específica (específica de Ag) na membrana da célula B tem uma forma recíproca à do antígeno. A ligação antígeno-imunoglobulina leva à ativação e à proliferação para produzir um clone de células B antígeno-específicas. Cada membro do clone especificamente ativado sofre então diferenciação em um plasmócito, que produz e secreta grandes quantidades de uma mesma imunoglobulina homogênea, com especificidade idêntica à da sIg que desencadeou a resposta na primeira instância.

A memória imunológica distingue a resposta imune adaptativa da resposta inata

A forma como a memória imunológica é gerada ainda é tema de muita investigação. Na reexposição ao mesmo antígeno, a resposta imune adaptativa, devido à reativação das células de memória longevas, monta uma resposta mais rápida e efetiva, comparada com a resposta primária. **A proteção duradoura oferecida pela vacinação é resultado da memória imunológica.** Existem diferenças claras entre as formas como os linfócitos "virgens" e de memória respondem a um antígeno. Por exemplo, as células "virgens" e efetoras têm um tempo de vida relativamente curto, mas os linfócitos de memória persistem por anos e, como resultado, fornecem frequentemente proteção vitalícia após exposição inicial. Adicionalmente, existem mais células de memória comparativamente com as células "virgens" específicas para o mesmo antígeno.

A resposta adaptativa é uma resposta integrada

A resposta imune adaptativa é mediada por elementos celulares e humorais; as células T são consideradas responsáveis pela imunidade celular e as células B responsáveis pela imunidade humoral. É importante considerar a resposta adaptativa como uma resposta integrada, não ocorrendo isolada. Por exemplo, muitos dos eventos e funções das células

T terão impacto no grau de eficiência da resposta das células B e na sua capacidade de produzirem os anticorpos adequados. Da mesma forma, as células B podem, por sua vez, ativar as células T. De modo interessante, esta resposta integrada se reflete também na imunidade inata. Por exemplo, as células da resposta imune inata evoluíram no sentido de serem mais eficientes quando os anticorpos tiverem sido produzidos, e podem responder às citocinas liberadas pelos linfócitos.

A resposta das células T

Existem populações distintas de células T. Todas as células T, assim que deixam o timo, expressam CD4 ou CD8 em sua superfície. Essa distinção fenotípica também tem importantes consequências em sua função efetora: a células T $CD4^+$ são muitas vezes chamadas **células T auxiliares (TH),** enquanto as células T $CD8^+$ são **células T citotóxicas (CTL).** As células TH podem ser ainda subdivididas. Inicialmente, elas eram divididas em TH1 e TH2, mas recentemente a evidência demonstrou que isso é excessivamente simplista. Existe bastante interesse atual no subtipo denominado TH17, pela sua liberação da citocina IL-17. As células T são também responsáveis pela regulação das atividades dos outros braços do sistema imune. Elas fazem isso por meio do contato direto célula-célula ou pela secreção de mediadores solúveis que interagem com as células relevantes, isto é, outras células T, células B, células envolvidas na resposta imune inata, como os macrófagos, ou células de outros tecidos. Os diferentes subtipos de células T são apresentados esquematicamente na Figura 38.7.

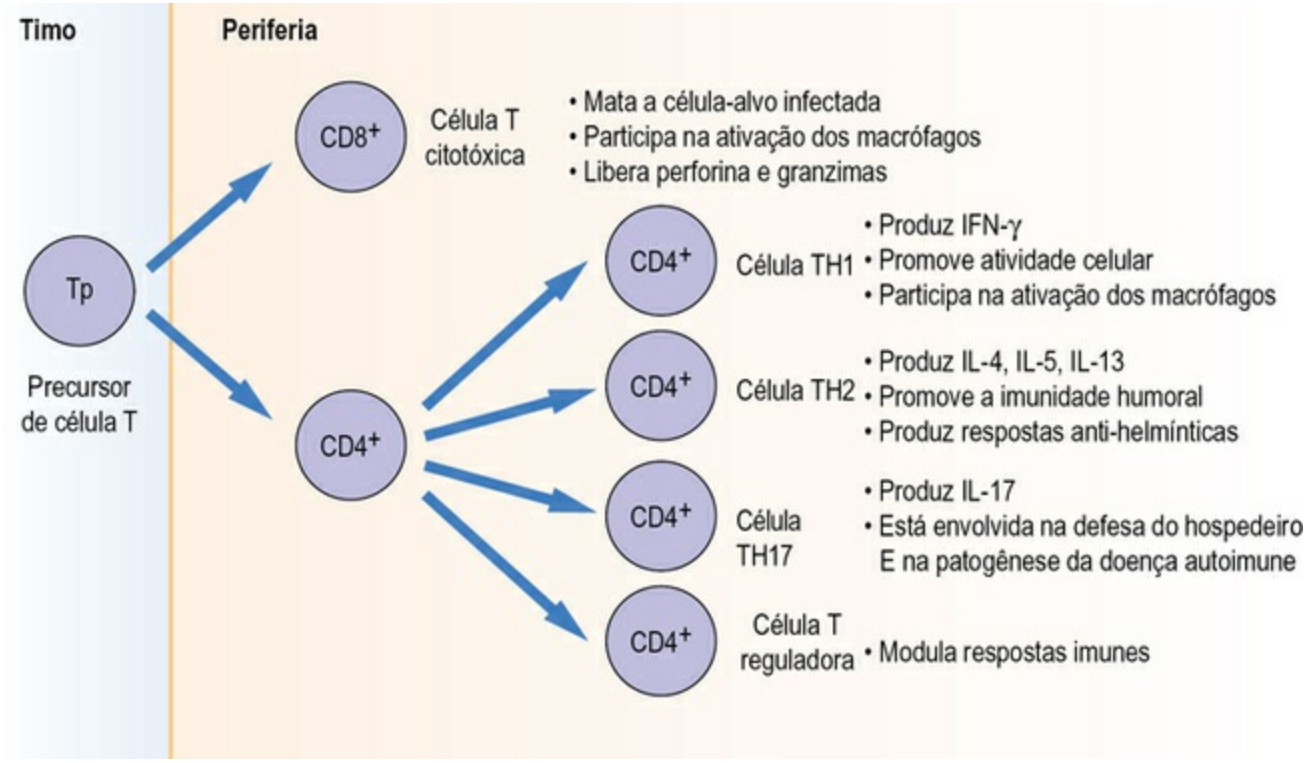


FIG. 38.7 Subtipos funcionais de células T.
As células precursoras de células T no timo se desenvolvem em células com diferentes funções efetoras.

Subtipos de células T auxiliares: TH1/TH2, TH17 e T reguladoras (Treg)

As funçõe efetoras das células $CD4^+$ parecem ser a de "auxiliar" outras respostas imunes. Dissemos anteriormente que as células T precisam ser apresentadas ao antígeno, no contexto do MHC, na superfície de uma APC: para as células T $CD4^+$, isso é feito por moléculas do MHC de classe II.

Essas células T reconhecem os peptídios antigênicos que foram processados pelas APC e expressos nos sulcos de ligação da molécula de MHC. Elas também recebem sinais coestimuladores quando os receptores na superfície da célula T se unem a ligantes na superfície das APC. Um exemplo disso é a interação entre o CD28 na célula T e o CD80/86 na APC. Uma vez ativada, a célula T se diferenciará, proliferará e executará funções efetoras adequadas.

Células TH1/TH2

A subdivisão nos subconjuntos TH1 e TH2 foi originalmente feita tendo por base sua função aparente. As células TH1 aparentavam funcionar como promotoras das respostas celulares. Uma vez ativadas, elas podiam liberar IFN-γ, que, por sua vez, promovia adicionalmente a atividade dos macrófagos. Além disso, elas podiam liberar TFN-α, que, por ativação endotelial e subsequente aumento da expressão de moléculas de adesão e quimiocinas, promoveria o recrutamento adicional de leucócitos. Além disso, elas podem fornecer auxílio às células B, acentuando a produção de anticorpos.

As células TH2 auxiliam as respostas celulares de uma maneira diferente. Elas também aparentam auxiliar as células B a produzir anticorpos e a produzir IgE por meio da liberação de IL-4. Também estimulam preferencialmente a inflamação conduzida por eosinófilos, pela produção de IL-5. No seu conjunto, promovem a principal resposta anti-helmíntica. Liberando IL-4 e IL-13, as células TH2 limitam a ativação TH1 dos macrófagos, e similarmente os produtos TH1 vão inibir as respostas TH2. Assim, as funções efetoras das células TH parecem ser determinadas pelo ambiente de citocinas que elas produzem e pela resposta requerida. Finalmente, a expressão de distintos fatores de transcrição parece ser crucial na condução do desenvolvimento TH1 ou TH2, sendo o fator de transcrição T-bet preferencialmente expresso por células TH1, e o GATA-3 pelo subtipo TH2.

Células TH17

Recentemente tem havido muito interesse em outro subtipo de células TH, que não se encaixa no paradigma original TH1/TH2. A célula TH17 foi inicialmente identificada em modelos animais de várias doenças autoimunes, incluindo esclerose múltipla, artrite reumatoide e doença inflamatória intestinal. A compreensão do papel potencial deste subtipo, particularmente na doença humana, é atualmente um importante foco de pesquisa. É sabido que, na presença de IL-6 e de TGF-β, e na ausência de IL-4 e de IL-12, o padrão será o de as células T CDA4 se tornarem TH17. Elas também vão requerer IL-21, ela própria um produto das células T, e a IL-23, produzida pelas APC. As células TH17 também parecem gerar IL-22. Esta é claramente uma rede complicada, e suas sutilezas continuam sob investigação. Já que a compreensão a partir dos modelos animais

implicou as TH17 na condução da patologia em diversas doenças autoimunes, pareceria que o papel natural e fisiológico das mesmas fosse a defesa do hospedeiro contra certos patógenos bacterianos, incluindo a *Klebsiella pneumoniae* e fungos, como a *Candida albicans*. A IL-17 e a IL-22 por elas produzidas atuam provavelmente em células do estroma e do epitélio locais do tecido infectado, promovendo a produção local de quimiocinas (IL-8), as quais, por sua vez, recrutam células efetoras inatas como os neutrófilos. Isso mostra novamente a interação de proximidade entre as respostas inata e adaptativa para a imunidade efetiva.

Células T reguladoras

Originalmente, as células que podem controlar uma resposta mediada por células foram identificadas como **"células supressoras".** No entanto, a descrição original de uma célula $CD8^+$ proporcionando esta função não é mais considerada válida. Os tipos celulares estudados neste momento são as chamadas células T reguladoras (Treg). Elas parecem ser um grupo heterogêneo. A mais estudada é a célula T $CD4^+$, que parece ser capaz de controlar a ação de outras células imunes mediante a combinação da liberação de mediadores solúveis (IL-10 e TGF-β) e do contato direto célula-célula. Pensa-se que essas células também expressam o fator de transcrição FoxP3, que aparenta ser crucial para o desenvolvimento das células T reguladoras. Como discutido previamente, o timo desempenha um papel importante na deleção das células T autorreativas antes de estas saírem para a periferia pelo mecanismo de tolerância central. Esse processo não é 100% eficiente e reconhece-se agora que as células T reguladoras têm um papel importante no processo de tolerância periférica (isto é, permanecer em vigilância das células circulantes que, se permitidas, seriam autorreativas e causariam autoimunidade). A tradução para as aplicações clínicas de prevenção da doença autoimune está atualmente sob investigação. O potencial das células Treg pode ser também aplicável à indução de tolerância em transplantes de órgãos.

As células T $CD8^+$ citotóxicas (CTL) matam células infectadas

A outra população importante de células T, com base em sua expressão superficial de CD8, é conhecida como células T citotóxicas. Seu papel é **principalmente o de matar células infectadas** (p. ex., por vírus). As células T $CD8^+$ reconhecem peptídios do antígeno associados ao MHC classe I à superfície da célula infectada. Fazendo isto, elas são capazes de limitar a infecção. É provável que, inicialmente, as células T $CD8^+$ "virgens" requeiram a ajuda das células T $CD4^+$, assim como a ativação pelas APC, para se tornarem células efetoras. Uma vez na periferia, as CTL efetoras vão se tornar ativadas quando encontrarem células infectadas por vírus. Elas se ligarão fortemente à célula infectada usando moléculas de adesão: o principal método para matar as células infectadas será pela liberação dependente de cálcio de proteases de serina conhecidas como granzimas, e de proteínas perforinas capazes de perfurar as membranas celulares a partir de seus grânulos. O resultado da liberação destas enzimas na célula infectada é a ativação da apoptose guiada por caspases (Cap. 42). As células apoptóticas são subsequentemente removidas por células fagocíticas inatas, como os macrófagos — as

“latas de lixo”.

A resposta imune humoral adaptativa

A resposta imune humoral é caracterizada pela liberação de anticorpos pelos linfócitos B plasmáticos completamente maduros

A imunidade humoral ou específica mediada por anticorpos é dirigida para a **infecção extracelular,** especialmente para bactérias e seus produtos, parasitas extracelulares, bem como para a fase extracelular da infecção viral. Os anticorpos também desempenham um importante papel na imunopatogênese de muitas respostas autoimunes ou aberrantes que resultam em hipersensibilidade. A resposta imune humoral é caracterizada pela liberação de anticorpos pelos plasmócitos completamente maduros da linhagem dos linfócitos B. Como os anticorpos reconhecem muitos tipos de moléculas, incluindo polissacarídios e lipídios, essa resposta é particularmente eficiente contra patógenos extracelulares. A ligação do anticorpo à superfície estrutural dos microrganismos bloqueia a adesão destas bactérias ou vírus e impede os efeitos prejudiciais de suas toxinas, em um processo chamado **neutralização.** Contudo, a simples ligação do anticorpo, na maioria das situações, não garantirá a eliminação do antígeno. Para promover esta resposta, o fragmento não ligante de antígeno da molécula (porção Fc) é capaz de ativar outros componentes da imunidade inata, por meio da ativação do complemento ou pela ligação aos receptores nos fagócitos. A diversidade de funções efetoras é obtida por recombinações genéticas dos genes de cadeia pesada e leve, como descrito anteriormente.

Os subtipos de células B estão envolvidos na resposta imune humoral

De forma semelhante à resposta celular, mediada por vários subtipos de células T, a resposta humoral utiliza subtipos distintos de células B. Como referido anteriormente, as células T, particularmente as células TH, interagem com as células B direta e indiretamente por intermédio de receptores de superfície celular e citocinas, respectivamente. Isso ocorre em um grau tão considerável que as respostas efetivas das células B são frequentemente descritas como sendo dependentes das células T. As células B denominadas **B-2** são encontradas nos folículos dos órgãos linfoides secundários. Elas respondem tipicamente a antígenos proteicos e produzem anticorpos de alta afinidade típicos das respostas humorais efetivas. Na zona marginal do baço, existe outra população de células B, que caracteristicamente responde a antígenos polissacarídios entregues pela corrente sanguínea. Eles tendem a secretar IgM, mas podem sofrer troca de classe para produzir IgG. Outra população, designada **B-1,** que expressa receptores similares, representa cerca de 5% de todas as células B e é encontrada em mucosas e no peritônio. Elas expressam IgM de superfície, como seu receptor antigênico, e pouca IgD de superfície (o padrão oposto ao das células B foliculares B-2 clássicas). As células B-1 demonstram uma resposta predominante de IgM, tipicamente contra antígenos não proteicos, sofrem pouca hipermutação somática e exibem pouco desenvolvimento de

memória.

Os anticorpos ilustram a capacidade do sistema imune para a diversidade

Para as respostas dependentes de células T, a reexposição ao antígeno induzirá uma resposta de anticorpos secundária. Os maiores níveis de anticorpos produzidos terão afinidade e avidez aumentada para o antígeno em particular, como consequência de processos de troca de classe de cadeia pesada e maturação de afinidade. O sistema imune humano normal é capaz de produzir um número ilimitado de anticorpos altamente específicos, com a capacidade de reconhecer qualquer e todos os elementos não próprios com os quais ele venha a ter contato. A falha no controle da resposta imune efetiva pode resultar na produção de anticorpos contra antígenos próprios, designados **"autoanticorpos",** e estes são característicos de várias **doenças autoimunes,** incluindo, entre outros, o **lúpus eritematoso sistêmico (LES)** e a **artrite reumatoide (AR).**

Os termos anticorpo, gama globulina e imunoglobulina são sinônimos

São reconhecidas cinco classes de imunoglobulinas — IgG, IgA, IgM, IgD e IgE, com subclasses reconhecidas para IgG (IgG1, 2, 3 e 4) e para IgA (1 e 2). Quando estudadas no nível molecular individual, nenhuma outra proteína exibe tanta variação de sequência de aminoácidos entre membros individuais da mesma classe ou subclasse. Isso é mais evidente nos domínios *N*-terminais de ambas as cadeias leves e pesadas, que são responsáveis pela porção de reconhecimento antigênico da molécula. Os anticorpos são capazes de discriminar entre moléculas que caracterizam a cápsula de revestimento externo de espécies bacterianas diferentes, que podem variar em apenas um aminoácido ou um resíduo de monossacarídio. Isto é consequência das dimensões da área reconhecida pela molécula de anticorpo, de 10-20 Å (10^{-10} m), sendo capaz, assim, de ser influenciada pela alteração da conformação tridimensional ocasionada pela mudança de um único resíduo.



Quadro clínico

Um homem jovem que desenvolveu súbitos sibilo e urticária generalizada: choque anafilático

Um homem jovem foi trazido à emergência em estado de choque com sibilo (um som alto à inspiração) e urticária generalizada. Um acompanhante disse ao médico que fez a admissão que o paciente tinha apresentado súbita dificuldade em respirar após comer um lanche. Suspeitou-se de alergia ao amendoim e foi feito o diagnóstico de **anafilaxia.** Uma injeção intramuscular de epinefrina foi administrada prontamente, bem como o tratamento com anti-histamínico intravenoso, corticosteroide e suporte cardiorrespiratório. O homem se recuperou.

Comentário

Enquanto o efeito fisiológico da resposta da IgE é considerado uma proteção contra a

infestação parasitária, essa resposta se vê subvertida naqueles que sofrem de **doenças atópicas** e **anafilaxia.**

A maior fração da IgE se liga via receptores Fc aos mastócitos nos tecidos. Quando o antígeno se liga e estabelece ligações cruzadas com suas IgE específicas nos mastócitos, desencadeia a sua desgranulação e a liberação de mediadores pré-formados (principalmente a histamina). Quando a **desgranulação do mastócito** é restrita a um local, isso geralmente dá origem apenas a reações localizadas na forma de rinite alérgica ou asma. Se o grau de sensibilização com a IgE específica de antígeno e/ou a carga antigênica for superior, pode ocorrer a desgranulação sistêmica, com consequente **choque anafilático.** Ocorre uma vasodilatação significativa, reduzindo a pressão sanguínea. Isso é acompanhado por grandes aumentos da permeabilidade da parede dos vasos, levando a inchaço substancial, que afeta particularmente a pele e outros tecidos conjuntivos frouxos, como os da laringe. O espasmo do músculo liso também ocorre, levando à broncoconstrição, com consequente dificuldade respiratória e chiado. Essas características são acompanhadas pelo aumento da atividade secretora das glândulas seromucosas nos tratos respiratório e gastrintestinal, assim como urticária da pele.

Os anticorpos são bons exemplos de como a função está intimamente relacionada com a estrutura

Os anticorpos (imunoglobulinas) são moléculas em forma de "Y" (Fig. 4.5). As extremidades dos braços interagem especificamente com o patógeno (antígeno) e o tronco fornece funcionalidade adicional ou efetora. Essa função secundária ou efetora confere ao anticorpo uma capacidade de iniciar respostas imunes que o ajudam a eliminar o patógeno ao qual é direcionado. Um exemplo disso é a ativação do complemento. As funções efetoras dos anticorpos encontram-se resumidas na Tabela 38.4.

Tabela 38.4

As funções efetoras dos anticorpos

Tipo	Funções
IgG	Neutralização Opsonização para neutrófilos e macrófagos Imunidade passiva para o feto via passagem transplacentária Ativação do complemento por meio da via clássica Citotoxicidade dependente de anticorpos e mediada por células Função *natural killer*: morte de células ligadas a anticorpos conseguida pelos receptores para a porção Fc Principal isotipo usado em uma resposta de anticorpos secundária
IgA	Defesa das superfícies mucosas; imunoglobulina mais predominante produzida pelos MALT Neutralização
IgM	Neutralização Ativadora mais eficiente da via clássica do complemento Isotipo predominante nas respostas primárias de anticorpos
IgD	Possível papel na transdução de sinal e na maturação de células B Significado da IgD circulante indefinido
IgE	O papel principal é a defesa das superfícies mucosas contra microrganismos multicelulares

A ativação do sistema complemento é uma das funções mais importantes dos anticorpos

A ativação do sistema complemento (Fig. 38.1) é uma das funções efetoras mais importantes dos anticorpos na resposta imune adaptativa. Isso é conseguido usando um conjunto de componentes designados **"via de ativação clássica",** que contempla C1q, C1r, C1s, C4 e C-2. A ativação sequencial desses componentes leva à ativação do componente central e de importância crítica, C-3, que é um requisito absoluto para a ativação completa do sistema complemento. Uma vez atingida esta última, o complexo terminal de ataque à membrana, que envolve os componentes C5, C6, C7, C8 e C9, é ativado. Esse complexo gera eventualmente uma estrutura anelar polimérica, que se insere nas membranas celulares das bactérias e é responsável pela lise celular. Essa via clássica é desencadeada pela ligação do C1q a uma IgG ou IgM que já esteja ligada ao seu antígeno específico.

Existem duas outras vias de ativação, ambas constituindo partes da resposta imune não específica; elas são provavelmente mais antigas em termos evolutivos e foram descritas previamente.

A Figura 38.8 sistematiza os elementos-chave da resposta imune adaptativa, apresentando as interrelações entre os componentes celulares e humorais.

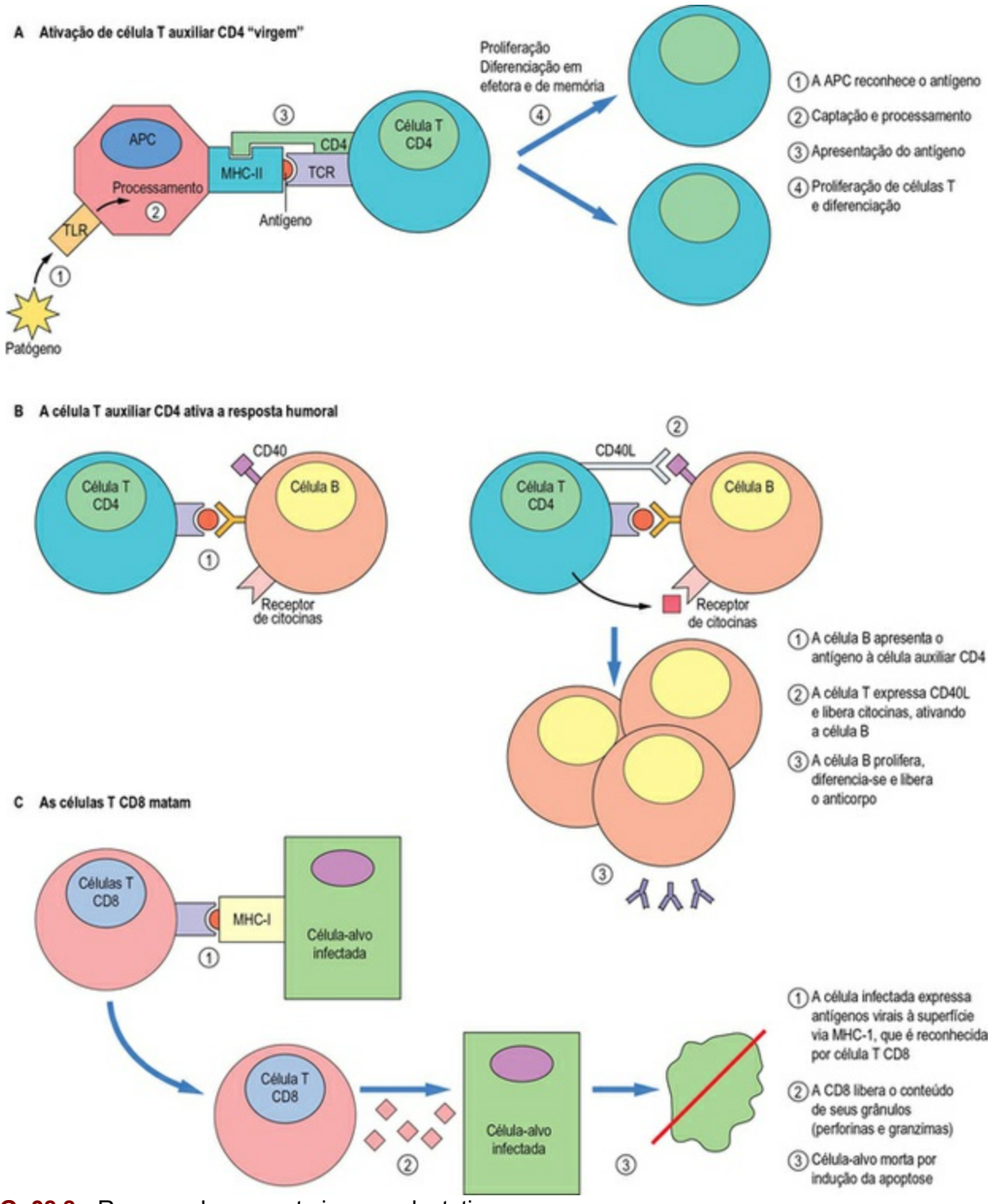


FIG. 38.8 Resumo da resposta imune adaptativa.
Inter-relações entre os componentes celular e humoral da resposta imune específica. As APC ativam as células T CD4 "virgens" que, por sua vez, podem ativar as células B. As células T citotóxicas matam as células-alvo infectadas.

Vacinação

A vacinação foi provavelmente a aplicação simples mais benéfica desenvolvida para fortalecer a resposta imune

O processo de vacinação ilustra bem as interações entre os braços humoral e celular da resposta imune adaptativa e as propriedades que melhor a caracterizam — **especificidade**

e memória. No primeiro encontro com o antígeno, o sistema imune e o antígeno interagem para selecionar linfócitos com receptores específicos para aquele antígeno. Estes sofrem ativação, proliferação e diferenciação em células efetoras de memória, um processo que pode demorar até 14 dias para se completar (Fig. 38.8). No entanto, o processo de produção de células de memória deixa uma população de células semiativada para aquele antígeno específico. Na exposição subsequente, a resposta é mais rápida em função do estado parcialmente ativado das células de memória. É também mais efetiva como consequência do grau de maturação da resposta, devido à diferenciação dos linfócitos já ocorrida.

Em relação às respostas de anticorpos, o primeiro contato desencadeia uma resposta predominantemente de IgM. No contato subsequente, os linfócitos B sofrem maturação adicional, diferenciação, troca de isotipo por meio do "auxílio" de células T apropriadas, e produzem de forma mais rápida uma resposta predominantemente de IgG. Isso providencia funções efetoras adicionais às obtidas apenas com IgM. É esta resposta fortalecida e mais específica que pode reduzir tanto a gravidade quanto a duração de qualquer dano causado pelo antígeno agressor.

A autoimunidade é normalmente evitada pela educação tímica; uma falha nos processos envolvidos pode levar à doença autoimune

Embora as atividades do sistema imune sejam benéficas em sua maioria, há diversas situações em que elas podem ter efeitos nefastos. Estas situações são mais bem consideradas como aberrações da qualidade, quantidade ou direcionamento da resposta.

Um aspecto particular desses distúrbios, o da **autoimunidade** (autorreatividade), é evitado pelos processos de tolerância central (durante a educação tímica) e de tolerância periférica, que induzem deleção clonal e anergia. Os clones autorreativos são eliminados ou tornam-se impotentes, quer por deleção no timo, quer por serem controlados por células T reguladoras na periferia. Esses mecanismos podem ser vistos como uma estratégia à prova de falhas em múltiplos níveis. Se esses processos falharem ou forem contornados, o estado resultante de autorreatividade e o dano inflamatório constituem a doença autoimune.

A forma da doença autoimune é determinada pelo antígeno-alvo e pela forma da resposta imune. Em suas formas mais simples, reações contra antígenos ubíquos levam ao que é conhecido como doenças autoimunes não específicas de órgão. Por outro lado, reações a componentes únicos de tecidos individuais, órgãos ou sistemas levam a doenças específicas de órgão. As primeiras são mais bem exemplificadas pelo **lúpus eritematoso sistêmico (LES),** no qual os antígenos-alvo aparentes são componentes comuns a todos os núcleos. O dano é observado em vários tecidos, incluindo pele, articulações, rins e sistema nervoso. Essas doenças, e as outras mencionadas na Tabela 38.5, são o foco das disciplinas de imunologia clínica e imunopatologia. Podem ser encontradas mais informações nos livros citados a seguir em "Leituras sugeridas".

Tabela 38.5

As consequências da falha do sistema imune

Autoimunidade	A resposta inapropriada a antígenos do próprio, pela quebra da autotolerância, pode levar a condições autoimunes **Exemplos**: artrite reumatoide, LES, diabetes melito tipo 1
Hipersensibilidade	A reação inapropriada ou exagerada a um patógeno ou antígeno pode frequentemente resultar em uma resposta que lesa mais o organismo do que sua própria causa **Exemplos**: febre do feno em resposta ao pólen, resposta anafilática a gêneros alimentícios, p. ex., amendoins
Imunodeficiência	A resposta imune ineficaz a uma infecção pode causar imunodeficiência. Isso pode muitas vezes ser hereditário ou induzido por infecção ou tratamento farmacológico
	A *imunodeficiência primária* é um defeito intrínseco de um ou mais componentes da resposta imune, p. ex., produção comprometida de anticorpos. **Exemplos**: agamaglobulinemia ligada ao X, que apresenta um nível muito baixo de células B e de imunoglobulinas séricas
	A *imunodeficiência combinada severa (SCID)* ocorre quando o timo falha no desenvolvimento e não há células T
	A *imunodeficiência secundária* pode se desenvolver após infecção, p. ex., AIDS, na qual o vírus infecta as células T CD4, ou como resposta a certos fármacos, p. ex., esteroides, que podem comprometer a função das células imunes



Quadro clínico

Uma criança com 2 anos com infecções recorrentes: estado de imunodeficiência

Uma criança de 2 anos apresentava um histórico de infecções recorrentes por *Candida albicans* e infecções dos pulmões. Os exames revelaram uma quantidade diminuída de neutrófilos, IgG e IgA. Testes da resposta proliferativa de linfócitos revelaram uma expressão diminuída de CD40L (CD154) nas células T. Um diagnóstico de síndrome de **hiper IgM ligada ao cromossomo X** foi feito e o tratamento intravenoso com imunoglobulina iniciado.

Comentário

Os estados de imunodeficiência são classificados como primários ou secundários. As **imunodeficiências primárias** são condições herdadas e, com mais de cem condições diferentes descritas, podem afetar todas as partes do sistema imune, tanto inatas quanto adaptativas. As **imunodeficiências secundárias** são frequentemente consequência de infecção (p. ex., HIV) ou de outras condições subjacentes ou fatores ambientais (p. ex., desnutrição).

O auxílio de células T é requerido para eficientes respostas de células B. São necessárias interações particulares para a mudança de isotipo de resposta IgM, que é típica de uma resposta primária de anticorpos, para isotipos IgG e/ou IgA, mais maduros, observados nas respostas secundárias de anticorpos, produzidas por desafios antigênicos subsequentes. O CD40L nas células T é necessário para interagir

com o CD40 em células B, "ajudando" a atingir esse objetivo. Em sua ausência, a produção de anticorpos é limitada à IgM e o indivíduo afetado fica imunocomprometido, devido à falta de outros isotipos importantes, tão críticos para a integridade da resposta imune. O problema de infecção mais normalmente associada a problemas celulares sugere que um defeito nas células T traz consequências funcionais para este braço da resposta imune.

Resumo

- A resposta imune integrada aos elementos (antígenos) não próprios ou próprios alterados é composta por vários componentes. Alguns destes exibem uma especificidade única para o(s) antígeno(s) estimulador(es) em particular e constituem a resposta imune adaptativa ou específica, enquanto outros reconhecem padrões patogênicos gerais e constituem a resposta imune não específica ou inata.
- A resposta inata representa a primeira linha de resposta e está presente em todos os eucariotos. As células e os mediadores solúveis envolvidos são primariamente aqueles associados aos processos de inflamação e de ativação vascular.
- A resposta adaptativa é mais refinada e geralmente invocada apenas mediante falha ou estimulação continuada da resposta inata. As células responsáveis pela resposta imune adaptativa são os linfócitos T e B. A especificidade que eles demonstram para o antígeno incitante é obtida por meio do uso de receptores antigênicos específicos, expressos em sua superfície celular, e da expansão clonal.
- As células T reconhecem o antígeno processado via receptores, interagindo com o antígeno apresentado pelas células portadoras de MHC. Isso leva à secreção de citocinas adicionais e à geração de funções efetoras, como a de célula T auxiliar e a de citotoxicidade mediada por células T, exercidas pelos subtipos de células T auxiliares e T citotóxicas, respectivamente. Historicamente, as respostas das células T foram denominadas resposta imune celular. Um subtipo diferente de células T $CD4^+$ é chamado "células T reguladoras", uma vez que atua controlando as respostas adaptativas e, em parte, previne autorreatividade pela resposta imune.
- As células B reconhecem antígenos nativos e secretam proteínas, chamadas anticorpos, que podem se ligar diretamente ao antígeno. Historicamente, as células B e seus produtos, os anticorpos, foram chamados de resposta imune humoral.
- Tanto as células B como as células T, bem como seus produtos, são capazes de recrutar e utilizar componentes da resposta inata de uma maneira mais eficiente e direcionada, com o objetivo de eliminar ou erradicar o antígeno.
- Além de demonstrar especificidade, a resposta imune adaptativa também demonstra outra característica de importância crítica que não é vista na resposta inata: a memória de seu encontro com um antígeno. O benefício é que, no contato subsequente com o mesmo antígeno, uma resposta reforçada e mais eficiente levará à remoção mais rápida do agente causador, esperando-se menos dano tissular do que no primeiro encontro.

Questões para aprendizagem

1. Quais são as características-chave das respostas imunes inata e adaptativa?
2. Por que o sistema imune inato evoluiu para múltiplos sistemas de receptores para o reconhecimento de patógenos?
3. Qual o papel das diferentes famílias de citocinas durante uma resposta imune?
4. Qual o papel do timo na resposta imune?
5. Compare a função dos linfócitos T e B.

Leituras sugeridas

Abbas, A. K., Lichtman, A. H. *cellular and molecular immunology*, ed 7. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier; 2012.

Chapel, H., Heaney, M., Misbah, S., et al. *Essentials of clinical immunology*, ed 5. Oxford: Blackwell; 2006.

Kumar, H., Kawai, T., Akira, S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol*. 2011; 30:16–34.

Liu, Z., Davidson, A. Taming lupus – a new understanding of pathogenesis is leading to clinical advances. *Nature Med*. 2012; 18:871–882.

MacPherson, G., Austyn, J. *Exploring immunology*. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell; 2012.

Murphy, K. *Janeway's immunobiology*, ed 8. London: Garland; 2011.

Shevach, E. M. Biological functions of regulatory T cells. *Adv Immunol*. 2011; 112:137–176.

CAPÍTULO 39

Endocrinologia Bioquímica

Robert K. Semple

Objetivos

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Os princípios que governam a sinalização endócrina e sua regulação.
- A anatomia básica, a organização e o papel regulador do hipotálamo e da pituitária.
- Os reguladores que controlam a biossíntese, o transporte e a ação dos hormônios tireoidianos.
- Os mecanismos que regulam a síntese e a ação dos glicocorticoides.
- A regulação da síntese e a atividade dos hormônios esteroides sexuais e seus papéis na reprodução humana.
- As ações diretas e indiretas do hormônio do crescimento, incluindo o papel do fator de crescimento 1 semelhante à insulina.
- O papel da prolactina na reprodução.
- As consequências das deficiências e dos excessos dos hormônios regulados pelo eixo hipotálamo-pituitária.

Introdução

Como uma primeira abordagem, o corpo humano contém 10 trilhões – ou 10 milhões de milhões – de células, as quais podem estar a mais de 2 metros de distância uma da outra. A coordenação e a regulação do crescimento e das múltiplas funções dessas células, de modo a suprir as demandas da existência em condições ambientais constantemente flutuantes, requerem sistemas integrados precisos e sofisticados. O **sistema nervoso** é uma parte chave da solução, sendo particularmente bem adaptado para mediar reflexos e ações motoras necessários, por exemplo, em situações de "luta ou fuga", as quais podem requerer respostas em frações de segundo. O **sistema endócrino**, no entanto, é o principal

meio de regulação de uma ampla faixa de funções menos agudas, incluindo crescimento, desenvolvimento, reprodução, muitos aspectos da homeostase e a resposta a estímulos externos e estresses mais crônicos. Essas respostas endócrinas ocorrem durante vários segundos em sua forma mais rápida e por dias ou semanas em sua forma mais lenta. Falhas nesses sistemas de controle endócrino altamente elaborados, complexos e frequentemente interconectados são comuns e levam a várias doenças altamente prevalentes.

Hormônios

Os hormônios são substâncias químicas produzidas por glândulas ou grupos de células particulares e que desencadeiam respostas específicas a partir de células ou órgãos distantes

O conceito de que os órgãos e tecidos podem produzir "secreções internas" que influenciam o comportamento de partes distantes do corpo provavelmente surgiu na França, no século XVIII, e no início do século XX a adrenalina e a vasopressina (hormônio antidiurético [ADH]) foram isoladas. No entanto, foi somente em 1905, logo após o isolamento da secretina, que Ernest Starling, em Londres, usou pela primeira vez a palavra "hormônio" para descrever esses mensageiros internos. Sabe-se agora que os hormônios são substâncias químicas produzidas por glândulas especializadas ou grupos de células e que induzem respostas específicas em células e órgãos distantes. Classicamente, esses hormônios provêm do sangue e são descritos como **hormônios endócrinos**. No entanto, subsequentemente ficou claro que alguns hormônios atuam localmente em células ao redor de sua célula de origem – conhecidos como **hormônios parácrinos** – ou mesmo na própria célula que os produziu – conhecidos como **hormônios autócrinos.**

Tipos de hormônios

Os hormônios possuem estruturas químicas variadas

Muitos tipos diferentes de moléculas funcionam como hormônios (Tabela 39.1). Entre os hormônios quimicamente mais simples estão os **aminoácidos modificados**, como a epinefrina (adrenalina), e muitas aminas simples análogas também funcionam como neurotransmissores (Cap. 41.1). No outro extremo do espectro, alguns hormônios são **polipeptídios** que variam em tamanho, desde tripeptídios (p. ex., hormônios liberadores da tireotrofina) a glicoproteínas complexas (p. ex., hormônio luteinizante [LH]). Os hormônios peptídicos menores são sintetizados como pró- -hormônios polipeptídicos grandes, que são clivados por enzimas proteolíticas para liberar o hormônio ativo da glândula endócrina. Por vezes, um pró-hormônio pode ser clivado de formas diferentes para produzir muitos hormônios diferentes, de acordo com o tecido e o contexto celular. Outros hormônios se originam da **modificação de lipídios simples**, como **colesterol** ou **ácidos graxos.**

Tabela 39.1

A derivação química dos hormônios

Hormônios derivados de aminoácidos	
Derivativos de aminoácidos	Catecolaminas, serotonina, tiroxina
Tripeptídios	TRH
Pequenos peptídios	AVP (ADH), somatostatina
Peptídios de tamanho intermediário	Insulina, hormônio paratireoidiano
Polipeptídios complexos e glicoproteínas	Gonadotrofinas, TSH
Hormônios derivados de precursores lipídicos	
Derivativos de colesterol	Cortisol, testosterona, estradiol, vitamina D
Derivativos de ácidos graxos	Prostaglandinas, leucotrienos
Derivativos de fosfolipídios	Fator de ativação de plaquetas
Hormônios derivados de outros químicos	
Purinas	Adenosina
Gases	Óxido nítrico

AVP/ADH, arginina vasopressina ou hormônio antidiurético; TRH, hormônio liberador de tireotrofina; TSH, hormônio tireoestimulante.

Muitas glândulas e tecidos produzem hormônios

Os hormônios são classicamente conhecidos por serem secretados por **glândulas sem ducto**, como a tireoide, as adrenais e a pituitária, as quais já são conhecidas pelos anatomistas há séculos. Contudo, muitos hormônios são tão potentes que precisam circular apenas em concentrações plasmáticas diminutas (p. ex., picomolares) para exercer efeitos biológicos significativos e podem se originar de pequenos grupos de células ou a partir de um tipo celular em particular espalhado em um grande órgão. Além do mais, está ficando claro agora que muitos tecidos que não eram tradicionalmente conhecidos por serem ativos em termos endócrinos na verdade secretam ampla variedade de diferentes hormônios com efeitos diversos em outros tecidos. De fato, a disponibilidade da sequência genômica humana, aliada à bioinformática e a técnicas mais sofisticadas, como o perfil transcricional baseado em microarranjos (Cap. 36), levou à descoberta de muitos novos hormônios e receptores hormonais suspeitos, e o entendimento dos mecanismos endócrinos que regulam a fisiologia humana provavelmente aumentará rapidamente. Apesar disso, neste capítulo a ênfase está nos processos hormonais já estabelecidos e que são o foco da endocrinologia clínica atual.

Quadro de conceitos avançados

Órgãos endócrinos não clássicos

Muitos tecidos distantes das clássicas glândulas endócrinas sem ducto são agora conhecidos por serem ativos endocrinologicamente; os sinais produzidos medeiam um "diálogo" metabólico importante entre diferentes tecidos. Exemplos disso incluem a produção de leptina a partir do **tecido adiposo branco**, o que sinaliza para o cérebro o armazenamento de energia (Cap. 22), a produção do fator de crescimento dos fibroblastos 23 (FGF23) a partir dos **ossos** (o que modula o manuseio do fosfato renal e é ectopicamente produzido por alguns tumores, levando a uma perda clinicamente importante de fosfato renal e à osteomalacia) e a produção de fatores de saciedade como a grelina a partir do **intestino delgado**. A **placenta** também é um tecido endócrino altamente ativo: além de produzir βHCG, progesterona, hormônio do crescimento placentário e lactogênio placentário humano, os quais têm papéis bem conhecidos na gravidez, ela produz muitos outros hormônios em altos níveis cujos papéis ainda estão por ser determinados.

Princípios da ação hormonal

De modo a funcionar efetivamente, levando sinais de uma parte do corpo para outras, os processos endócrinos devem exibir certas propriedades gerais (Fig. 39.1).

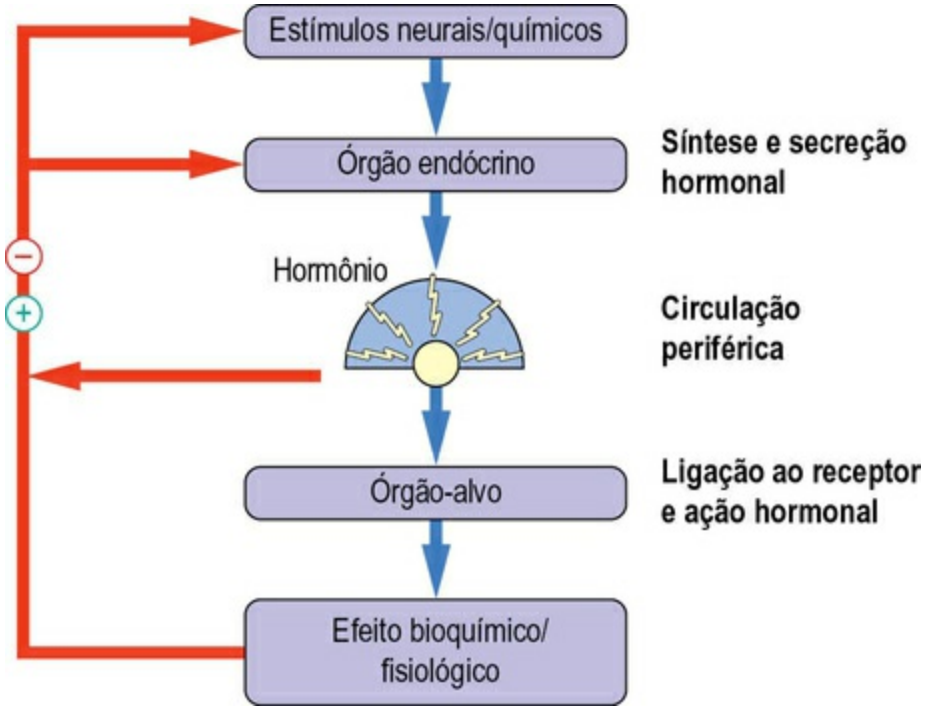


FIG. 39.1 Processos endócrinos básicos. A regulação retroativa da ação hormonal é um exemplo clássico de autorregulação. A regulação por retroalimentação negativa é comum. A retroalimentação positiva (o *feed-forward loop*) é rara. Note como as relações de retroalimentação operam em diferentes níveis do sistema endócrino.

Acoplamento da liberação hormonal aos estímulos relevantes

Alguns hormônios funcionam para transmitir ao corpo informações ambientais importantes, enquanto outros estão mais relacionados com a calibração de processos metabólicos envolvidos na manutenção da homeostase

Em ambas as situações é essencial que haja uma tradução efetiva da magnitude do estímulo na quantidade de hormônio liberado. Como isso é alcançado varia, dependendo do estímulo. Mecanismos simples de sensibilidade homeostática incluem, por exemplo, o acoplamento direto da liberação do hormônio paratireoidiano aos níveis de cálcio por meio de receptores de superfície celular que se ligam ao cálcio (Cap. 26) e o acoplamento direto da secreção de insulina aos níveis plasmáticos de glicose pela sensibilidade das células β pancreáticas à concentração de glicose sanguínea (Cap. 21). Muitos dos processos endócrinos descritos neste capítulo, ao contrário, são controlados por **neurônios modificados** que secretam hormônios na corrente sanguínea. O nível de secreção desses neurônios é frequentemente determinado por complexos sinais de entrada sinápticos de várias partes diferentes do cérebro, assim como pela sensibilidade aos metabólitos circulantes e hormônios. Esses neurônios secretórios funcionam, portanto, como sítios importantes de integração de uma variedade de informações ambientais, psicológicas e fisiológicas.

Retroalimentação negativa: a principal característica do sistema endócrino

A principal característica da maioria dos processos endócrinos é a **retroalimentação negativa** (Fig. 39.1). Isso significa que a resposta induzida pela ação de um hormônio retroalimenta a inibição do nível de sua produção. O efeito disso é a atenuação das flutuações no processo controlado pelo hormônio, acentuando assim a estabilidade desse processo e, consequentemente, da homeostase. Contudo, se as retroalimentações negativas fossem o único processo em jogo, consequentemente a resposta do sistema permaneceria constante. De fato, muitos processos endócrinos, principalmente os controlados pelo hipotálamo, apresentam um **ritmo** distinto. Isso é determinado pelo produto líquido dos sinais de entrada neurais para os neurônios secretórios relevantes, e, nessa situação, a retroalimentação negativa serve alternativamente para suavizar as alterações do perfil hormonal e prevenir instabilidades de curta duração. Além disso, a modulação da suscetibilidade dos neurônios controladores à inibição retroativa representa um mecanismo potencial de modulação do nível de resposta do sistema endócrino.

A **retroalimentação positiva** se refere a um maior estímulo da produção ou liberação hormonal pela resposta que ele provoca. Essa alça de alimentação por "empuxo" é inerentemente instável e leva a um aumento rápido e exponencial no nível do sinal. Ela é **muito mais rara** do que a retroalimentação negativa na fisiologia, mas desempenha um papel importante em alguns processos que requerem um ajuste de tempo preciso, como o pico de aumento de hormônio luteinizante que aciona a ovulação.

Transdução de sinais nos tecidos-alvo: receptores hormonais

Os hormônios atuam pela ligação a receptores específicos, tanto na superfície celular quanto dentro da célula-alvo (Cap. 40)

Classicamente, há um alto grau de especificidade nessa ligação e é essa interação hormônio-receptor que dispara e coordena uma ampla faixa de efeitos biológicos. Os receptores hormonais podem ser divididos em diferentes famílias de acordo com suas estruturas, e cada família compartilha amplamente de mecanismos de transdução de sinais.

Muitos hormônios e peptídios semelhantes a aminas atuam via receptores que são proteínas intrínsecas da membrana plasmática

Muitos hormônios e peptídios semelhantes a aminas que não podem atravessar as bicamadas lipídicas atuam via receptores acoplados a proteínas G, enquanto alguns peptídios maiores atuam via receptores de tirosina cinase (p. ex., a insulina e o fator de crescimento 1 semelhante à insulina [IGF-1]) ou receptores semelhantes a citocinas (p. ex., a leptina e o hormônio de crescimento). Todos esses tipos de receptores são proteínas intrínsecas da membrana plasmática e dependem de cascatas de eventos sequenciais de fosforilação para alterar a atividade enzimática e a expressão gênica.

Os hormônios lipofílicos entram nas células antes de se ligarem a seus receptores

Pelo contrário, os hormônios lipofílicos, incluindo os hormônios esteroides, alguns hormônios derivados de ácidos graxos e a tri- -iodotironina, que tem propriedades físico-químicas em comum com os esteroides (Cap. 17), entram nas células antes de se ligarem a seus receptores. Estes, conhecidos como **receptores hormonais nucleares**, são efetivamente fatores de transcrição ativados por ligantes e fornecem uma ligação muito direta entre a exposição de uma célula a um ligante hormonal e a alteração de padrões de expressão gênica (Cap. 35).

Muitos **receptores potenciais de hormônios desconhecidos** têm sido identificados em virtude da homologia de sequência entre membros de cada uma das principais classes de receptores hormonais. É provável que a identificação do ligante para esses receptores "órfãos" amplie significativamente a lista de hormônios endócrinos. Tais genes putativamente codificantes de receptores são também um importante alvo de investigação farmacêutica devido à relativa facilidade pela qual os receptores podem ser visados por novos fármacos.

Desligando o sinal hormonal

Os níveis dos hormônios são sinais fisiológicos úteis somente se também houver uma via efetiva de desativação dos seus sinais

A inativação hormonal geralmente ocorre por metabolismo adicional (p. ex., proteólise dos peptídios ou hidroxilação, conjugação e excreção de muitos esteroides). Essa degradação pode ocorrer no plasma, em órgãos como o fígado e em tecidos-alvo após a internalização do hormônio mediada pelo receptor. A taxa de eliminação dos diferentes hormônios varia enormemente, desde poucos minutos (insulina) até horas (esteroides) ou mesmo dias (tiroxina). A **medida das concentrações urinárias dos hormônios** ou de seus metabólitos pode ser usada em alguns testes para diagnóstico, incluindo os de confirmação de gravidez e de patologias como tumores adrenais.

Proteínas carreadoras e hormônios "livres"

Muitos hormônios pequenos ou hidrofóbicos são transportados no plasma ligados a proteínas carreadoras

Na circulação, muitos hormônios pequenos ou hidrofóbicos são transportados ligados a proteínas carreadoras. Por exemplo, a tiroxina e o cortisol são transportados em proteínas do plasma, tal como a globulina transportadora de hormônio da tireoide (TBG) e as globulinas de ligação a corticoides (CBG). Isso tem diversas consequências de relevância, tanto para as medidas fisiológicas quanto clínicas. As proteínas transportadoras estendem a meia-vida biológica e aumentam a concentração plasmática dos hormônios menores, os quais, de outro modo, seriam rapidamente eliminados no fígado ou rins. Isso também significa que pode haver grandes diferenças entre os níveis plasmáticos totais do hormônio e do hormônio não ligado ou "livre" em solução, o qual é geralmente a forma biologicamente ativa. Logo, a interpretação clínica dos níveis hormonais plasmáticos é mais simples se os ensaios são desenvolvidos para detectar somente o hormônio livre, senão devem ser feitas suposições sobre os níveis de proteínas ligantes, o que, por sua vez, pode ser significativamente influenciado pelas condições nutricional e hormonal. Um exemplo comum do problema levantado pelos níveis variáveis de proteínas carreadoras surge na avaliação dos níveis de cortisol em mulheres tomando pílulas contraceptivas que contêm estrogênios, as quais estimulam os níveis de proteínas ligantes e, como tais, tornam inaplicáveis os intervalos laboratoriais de referência usuais para o cortisol. Não são apenas os hormônios lipofílicos pequenos que têm proteínas plasmáticas de ligação; tanto o hormônio do crescimento (GH) quanto o IGF-1 têm proteínas plasmáticas de ligação que influenciam a biodisponibilidade e a atividade tecidual dos hormônios de várias maneiras diferentes (Tabela 39.2).

Tabela 39.2

Principais proteínas ligantes de hormônios

Hormônio	Proteína ligante	Porcentagem aproximada de ligação	Observações
Tiroxina	Globulina ligante dos hormônios tireoidianos (TBG) Albumina Transtirretina	75% 10%-15% 10%-15%	Aumento clinicamente significativo na gravidez inicial
Testosterona	Globulina ligadora de hormônios sexuais (SHBG)	60%-70%	Os níveis de SHBG são fortemente regulados hormonalmente (p. ex., suprimidos pela insulina e aumentados pelos hormônios tireoidianos)
Cortisol	Globulinas ligante de cortisol (CBG)	75%	As variações de suas proteínas ligantes podem ser enganosas, assim como é o caso da dosagem do cortisol total geralmente medido. Logo, mulheres que tomam estrogênios (aumento do CBG) podem ter o cortisol total alto, mas o cortisol livre normal, enquanto em doenças graves ou desnutrição ocorre o contrário
	Albumina	15-20%	
GH	Proteína carreadora de hormônio do crescimento (GHBP)	50%	A GHBP é um fragmento solúvel do receptor GH. Essa é uma característica comum de muitos hormônios semelhantes a citocinas
IGF-1	Proteína ligante ao fator de crescimento semelhante à insulina tipo III (IGFBP-III)	75%	Há 6 IGFBPs que modulam a atividade parácrina do IGF-1 e podem ter papéis de sinalização por si próprias



Quadro de conceitos avançados

Preservação de "marcas" epigenéticas (*imprinting*) em endocrinologia

A expressão gênica pode ser influenciada não só pela sequência de genes no DNA e por suas regiões promotoras, mas também por modificações covalentes do DNA e/ou histonas. A **metilação de resíduos de citosina** ocorre particularmente nas regiões promotoras e atua **silenciando genes**, por exemplo, durante a diferenciação de tecidos. Durante as fases mais precoces do desenvolvimento, a maioria destas "marcas" epigenéticas é eliminada para gerar células-tronco totipotentes. Contudo, elas são preservadas em alguns genes, e esse padrão de modificações covalentes revela frequentemente de qual progenitor o gene foi herdado. Uma vez que as marcas epigenéticas são preservadas à medida que as células se dividem, os principais efeitos do "progenitor de origem" podem ser subsequentemente observados na expressão

gênica em alguns ou em todos os tecidos.

Diversos processos endócrinos apresentam um *imprinting* significativo. O mais conhecido é o sistema receptor IGF-II-IGF-II, que atua influenciando o crescimento placentário e fetal, em comum com quase todos os genes impressos conhecidos. Outro importante gene de sinalização endócrina que sofre *imprinting* é o GNAS, codificando uma subunidade da proteína G estimulatória, acoplada a muitos receptores endócrinos clássicos de hormônios peptídicos. Várias mutações diferentes têm sido descritas e, dependendo de qual progenitor elas foram herdadas, podem produzir displasia esquelética e resistência a vários hormônios, incluindo mais frequentemente o hormônio paratireoidiano. De fato, o conhecido "pseudo-hipoparatireoidismo" foi o primeiro exemplo relatado de resistência de um órgão-alvo a um hormônio. Para uma revisão da biologia fascinante e complexa do GNAS, os leitores devem procurar Weistein LS et al. Minireview: GNAS: normal and abnormal functions. *Endocrinology* 2004; 145:5459-5464.

Metabolismo local dos hormônios nos tecidos-alvo

Outra característica de alguns processos endócrinos, particularmente aqueles que envolvem os hormônios esteroides, é o metabolismo local dos hormônios e pró-hormônios próximo de seus respectivos receptores

Isso pode envolver a conversão de um hormônio circulante ativo para uma forma mais potente (p. ex., testosterona para di- hidrotestosterona pela 5α-redutase nos folículos capilares dependentes de androgênios e na glândula prostática) ou a criação de um hormônio ativo a partir daquele que é efetivamente um pró-hormônio circulante (p. ex., tiroxina para tri-iodotironina pela deiodinase ou a síntese do estradiol a partir de androgênios adrenais no tecido adiposo). Um mecanismo similar também é empregado para evitar que os receptores de mineralocorticoides no rim sejam expostos a altas concentrações de cortisol, com o cortisol sendo inativado pela 11β-hidroxi-esteroide desidrogenase tipo II, que é altamente expressa próximo aos receptores de mineralocorticoides. Muitos outros exemplos dessa interconversão intracelular dos hormônios esteroides têm surgido, e o estudo desse fenômeno tem sido algumas vezes apelidado de "intracrinologia" (Tabela 39.3).

Tabela 39.3

Exemplos do metabolismo hormonal nos tecidos-alvo

Hormônio	Enzima	Substrato	Efeito do produto na atividade
Tiroxina (T_4)	Deiodinase tipo 2	Tri-iodotironina (T_3)	Gera uma potente T_3 a partir da T_4 quase inativa nos tecidos-alvo
Testosterona	Aromatase	Estrogênio	Além de desempenhar um papel importante no ovário, gerando estrogênio, a aromatase é expressa em outros tecidos, incluindo osso, tecido adiposo e hipotálamo. Mesmo nos homens, essa conversão local de androgênio em estrogênio é importante na mediação dos efeitos da testosterona na densidade óssea e na retroalimentação negativa central na produção de LH/FSH
Testosterona	5α-redutase	Di-hidrotestosterona	Produz um ligante mais potente para o receptor de androgênio, amplificando a atividade da testosterona localmente: a deficiência genética produz pseudo-hermafroditismo
Cortisol	11β-hidroxiesteroide desidrogenase tipo II	Cortisona	Converte o cortisol, o que ativa o receptor de mineralocorticoides, em cortisona, que não ativa o receptor. A enzima é altamente expressa em tecidos sensíveis aos mineralocorticoides, como o rim. A deficiência genética leva à exposição dos receptores de mineralocorticoides a altas concentrações do ligante ativo, levando à hipertensão grave e à hipocalemia na síndrome do excesso aparente de mineralocorticoides

Vários hormônios podem controlar um processo ou um hormônio pode controlar vários processos

Embora possa ser conveniente pensar no sistema endócrino como sendo compartimentalizado de modo que um hormônio tenha controle sobre todo um processo, esse raramente é o caso

Por exemplo, pelo menos quatro hormônios diferentes estão envolvidos na regulação da concentração plasmática de glicose (Cap. 21). Alternativamente, um único hormônio, tal como a testosterona, pode influenciar uma série de processos metabólicos.

Todas essas características do sistema endócrino serão ilustradas posteriormente neste capítulo por alguns ou por todos os eixos endócrinos que passam pela pituitária, a ser discutida.

Avaliação bioquímica da ação hormonal

Os testes laboratoriais dos processos endócrinos têm como objetivo determinar se o sistema está funcionando anormalmente e localizar o defeito funcional

Mais comumente, isso significa que os níveis do hormônio que induzem a resposta nos tecidos-alvo são determinados, geralmente, por imunoensaio (Fig. 39.2), juntamente com a medição de um ou mais hormônios tróficos anteriores, onde eles existem. A presença da regulação por retroalimentação negativa significa que o sistema tentará corrigir as perturbações nos níveis do hormônio efetor com mudanças compensatórias nos níveis

dos hormônios tróficos. Logo, a avaliação de pelo menos dois pontos nessa alça de retroalimentação endócrina é essencial e permite a focalização do diagnóstico posterior por imagem na glândula envolvida.

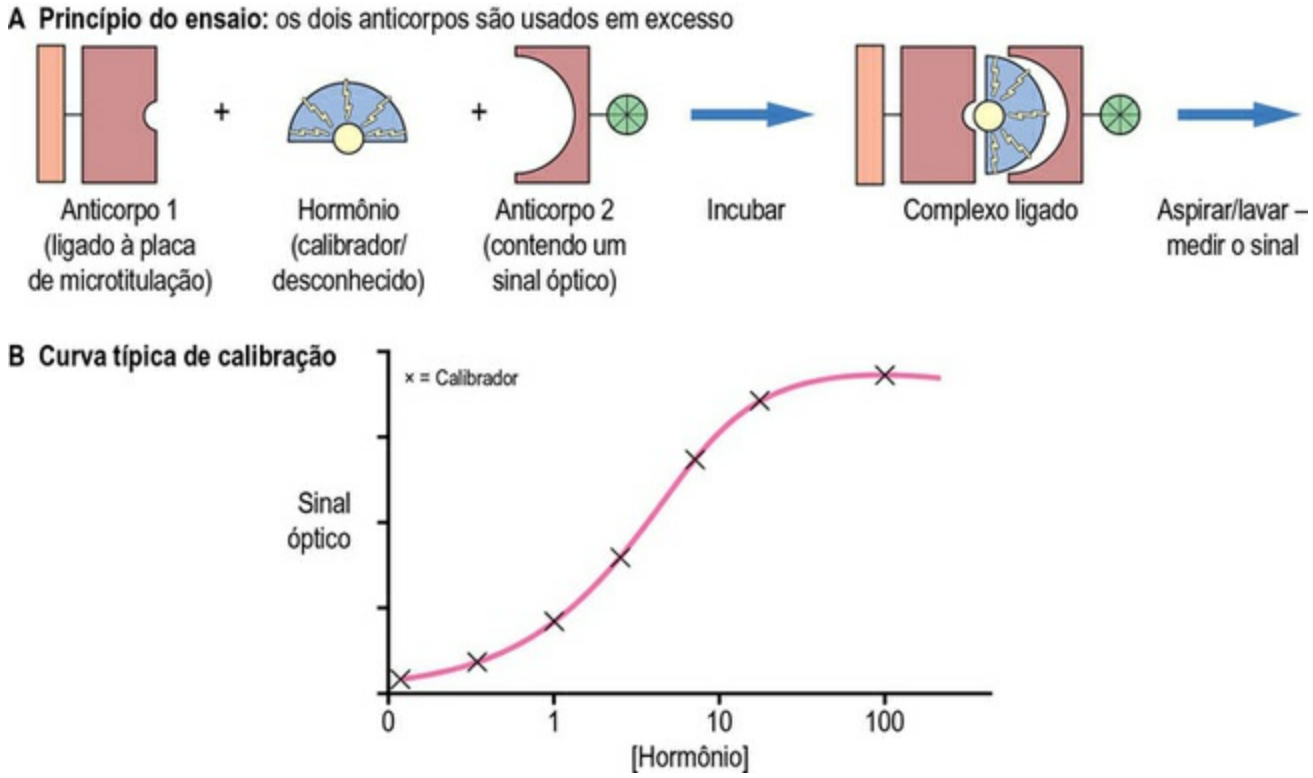


FIG. 39.2 Esquema para o ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA) para a medição da concentração hormonal. **(A)** A quantidade de sinal presente na microplaca após lavagem do soro e dos reagentes é uma medida da concentração de um hormônio. **(B)** A curva de calibração é uma série de medições de amostras com uma concentração conhecida de hormônio (calibradores). Subsequentemente, o sinal obtido a partir das amostras desconhecidas é comparado com a curva-padrão, e a concentração de hormônio é determinada.

Uma vez que os hormônios de maior interesse para o diagnóstico do problema clínico tenham sido escolhidos, deve-se ter cuidado para assegurar uma coleta apropriada. Isso deve ser levado em consideração se o hormônio for muito instável (p. ex., muitos hormônios peptídicos pequenos requerem que as amostras sanguíneas sejam colhidas em tubos contendo inibidores de proteases, os quais são mantidos em gelo) e também se ele for produzido em um ritmo circadiano ou outro tipo de ritmo. Para alguns hormônios que têm meia-vida muito longa, como a tiroxina, o horário de coleta não é crítico, enquanto para outros, como o cortisol, a padronização do horário é essencial.

As dosagens individuais são desprovidas de significado no caso de hormônios com secreção pulsátil

Outro fator que deve ser levado em consideração no teste de hormônio é se a sua secreção é ou não pulsátil. Quase todos os hormônios hipotalâmicos e pituitários mostram algum grau de pulsatilidade na secreção. Na maioria dos casos isso significa simplesmente que é necessário repetir o teste no caso de anormalidades leves, enquanto para alguns hormônios, como o GH, que tem meia-vida curta e picos de secreção muito

evidentes, as medições únicas são frequentemente sem sentido.

Por causa desses problemas, os endocrinologistas comumente solicitam dosagens múltiplas para construir um perfil dos níveis hormonais em vários pontos do dia. Isso pode ser um modo efetivo de detectar perturbações sutis no ritmo circadiano e também pode diminuir o impacto da secreção oscilatória do hormônio.

Alguns hormônios são dosados após a aplicação de um estímulo relevante

Outra abordagem é usar o teste provocativo. Em outras palavras, os níveis hormonais são medidos não somente no estado de repouso, mas também após um estímulo significativo ter sido aplicado, em uma tentativa de avaliar a capacidade máxima de resposta da glândula ou do processo endócrino que está sendo testado. Frequentemente o estímulo é uma **alta dose de hormônio trófico** (p. ex., hormônio adrenocorticotrófico [ACTH], hormônio liberador de tireotrofina [TRH], hormônio liberador de gonadotrofina [GnRH] etc.); no entanto, em vez disso, ele pode ser um **desafio metabólico** (p. ex., com carga oral de glicose ou hipoglicemia grave induzida por insulina para mimetizar o estresse). Exemplos de cada um desses testes são dados na Tabela 39.4.

Tabela 39.4

Exemplos de testes endócrinos provocativos comumente utilizados

Eixo endócrino	Estímulo	Medição	Fundamento/uso
H-P-Adrenal	ACTH sintético	ACTH	O cortisol testa a integridade funcional das glândulas adrenais, que por sua vez depende das ações crônicas do ACTH. Esse também é um teste indireto do eixo hipotálamo-pituitária.
H-P-Adrenal	Hipoglicemia induzida por insulina	Cortisol	A hipoglicemia grave mimetiza o estresse fisiológico e testa confiavelmente o hipotálamo.
H-P-Tireoide	TRH	TSH	O padrão da liberação do TSH após a estimulação do TRH fornece informações que podem ser úteis no diagnóstico do hipotireoidismo central.
H-P-Crescimento	Hipoglicemia induzida por insulina	GH	A pulsatilidade basal do GH é superada pela aplicação de um forte estímulo para sua liberação.
H-P-Crescimento	Carga oral de glicose	GH	A falha da supressão do GH pela glicose é usada no diagnóstico da acromegalia.

H-P, hipotálamo-pituitária.

Principais tipos de patologia endócrina

A autoimunidade contra a tireoide, a adrenal e as ilhotas pancreáticas representa mais de 50% de todas as doenças autoimunes específicas de órgãos

Embora cada processo endócrino possa funcionar anormalmente como consequência de uma doença ou de um dano órgão- -específico, relacionado, por exemplo, com o local

anatômico da glândula, há também alguns tipos gerais de patologia nos quais as células endócrinas são muito suscetíveis. A primeira delas é a **destruição autoimune por anticorpos glândula-específicos**. Essa é uma causa potencial da perda de função de quase todas as glândulas endócrinas e, menos frequentemente, também pode levar a seu hiperfuncionamento. De fato, a autoimunidade contra a tireoide, a adrenal e as ilhotas pancreáticas é responsável por mais de 50% de todas as doenças autoimunes órgão-específicas. Isso parece, em parte, ser devido à predisposição genética, relacionada tanto com genes do complexo principal de histocompatibilidade [MHC] quanto não MHC, e também por fatores ambientais pouco definidos (Cap. 38).

O segundo grande grupo de patologias que se apresentam como doenças endócrinas é a neoplasia, a qual pode ser benigna ou maligna

As células neoplásicas surgem como clones autônomos nas glândulas endócrinas devido às **mutações somáticas nas vias de sinalização do fator de crescimento** ou comumente nas **vias de sinalização acopladas à proteína G**. Elas podem produzir uma doença devido à produção excessiva e desregulada de hormônios biologicamente ativos ou devido a danos a células endócrinas normais vizinhas, com perda concomitante da secreção hormonal. Adenomas muito pequenos e benignos que permaneceriam não detectados nos tecidos não endócrinos podem produzir doença ruborizante em virtude da hipersecreção hormonal acoplada à potência do hormônio na indução de respostas biológicas.



Quadro clínico

Imunoensaio hormonal

O imunoensaio é a técnica mais amplamente aplicada para a medição dos níveis hormonais. São produzidos anticorpos que reconhecem regiões antigênicas do hormônio. Idealmente, esses anticorpos devem ter alta especificidade e alta afinidade pelo hormônio de interesse, como, por exemplo, a subunidade β dos hormônios glicoproteicos.

Nos primeiros imunoensaios, os anticorpos eram obtidos do soro de uma espécie animal (p. ex., coelho ou carneiros) e imunizados com preparações de hormônios humanos. Esses antissoros continham uma série de anticorpos distintos (policlonais) capazes de se ligar a diferentes sítios do antígeno (o hormônio). No entanto, a especificidade e a concentração do(s) anticorpo(s) variavam com o animal e a duração da resposta imunológica.

Hoje, a maioria dos imunoensaios utiliza **anticorpos monoclonais**, que são produzidos pela fusão das células do baço de um camundongo imunizado com células de uma linhagem de mieloma de camundongo. As células fusionadas, ou hibridomas, podem ser clonadas para se obter uma linhagem celular que secreta uma única espécie de anticorpo por um período infinito.

Muitos produtores comerciais estabeleceram protocolos patenteados para

quantificar a interação hormônio-anticorpo. Um dos formatos mais amplamente utilizados é o ensaio imunométrico de dois sítios (sanduíche) ou **ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA)**, esboçado na Figura 39.2. Esse ensaio utiliza dois anticorpos que se ligam a diferentes epitopos no hormônio, um dos quais é marcado ou modificado para ser capaz de gerar um sinal óptico. Sistemas espectrofotométricos, fluorométricos, de luminescência e traçadores (marcadores) radioquímicos estão comumente em uso.

Nem todos os imunoensaios utilizam anticorpos marcados: outras abordagens incluem a **nefelometria**, na qual a formação dos complexos antígeno-anticorpo imunológicos, desviadores de luz, é monitorada espectrofotometricamente.

Tal como as patologias que ocorrem em células ou órgãos endócrinos, a própria natureza dos hormônios e sua frequente disponibilidade em preparações médicas significam que eles podem também causar problemas clínicos quando usados exogenamente, ou como efeito secundário de uma ação terapêutica desejada (p. ex., corticosteroides usados na doença inflamatória, causando ganho de peso e diabetes), ou devido a autoadministração inapropriada (p. ex., hormônio da tireoide para induzir a perda de peso).

O Sistema regulador hipotálamo-pituitária

Os hormônios da pituitária posterior são distintos daqueles da pituitária anterior

A glândula pituitária (ou hipófise) é um órgão oval, do tamanho de uma ervilha, encaixado em uma cavidade óssea do crânio (sela túrcica) abaixo do cérebro. Ela se comunica com o hipotálamo através da haste pituitária, que contém um arranjo complexo de axônios e vasos sanguíneos portais (Fig. 39.3). A glândula pituitária é dividida em dois lobos. A **pituitária posterior** (ou neuro-hipófise) é embriologicamente parte do **cérebro** e consiste principalmente em neurônios cujos corpos celulares estão nos núcleos supraóptico e paraventricular do hipotálamo. É nesses corpos celulares que os hormônios são sintetizados e empacotados antes do transporte pelos microtúbulos ao longo dos axônios na pituitária, onde são liberados. O **lobo anterior** (adeno-hipófise), representando aproximadamente 80% da glândula, é derivado embriologicamente do **ectoderma oral** e não tem continuidade anatômica direta com o cérebro. Diferentemente, ele pode ser visto como um órgão-alvo dos hormônios endócrinos liberados dos núcleos hipotalâmicos e transportados da eminência mediana pela circulação portal.

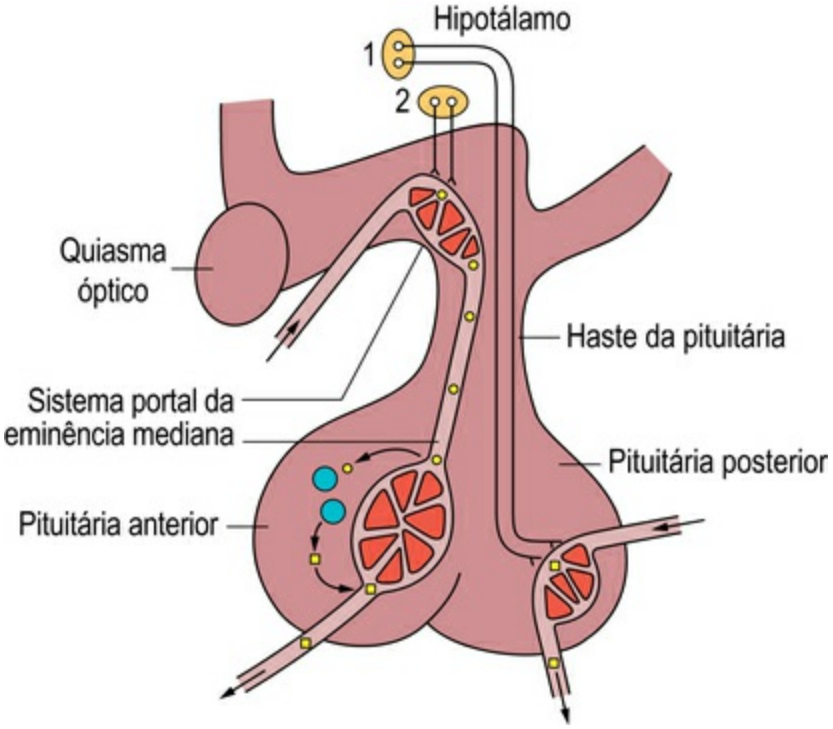


FIG. 39.3 O sistema regulador hipotálamo-pituitária anterior. Os hormônios da pituitária posterior são sintetizados e empacotados nos núcleos supraóptico e paraventricular do hipotálamo **(1)**, transportados pelos axônios e armazenados na pituitária posterior antes da liberação para a circulação. Os hormônios que estimulam ou inibem a liberação de hormônios pela pituitária anterior são sintetizados em vários núcleos hipotalâmicos e **(2)** transportados para a eminência média. De lá eles viajam até a pituitária anterior pelo sistema venoso portal.

Tanto a pituitária anterior como a posterior são controladas amplamente pelo hipotálamo

O hipotálamo é um centro altamente conectado ao SNC, recebendo sinais sinápticos de inúmeras partes diferentes do cérebro e sentindo sinais periféricos por meio de áreas de porosidade na barreira hematoencefálica. Logo, o hipotálamo funciona como um centro integrado que orquestra um número enorme de processos endócrinos e neurais, carreando estímulos externos relevantes a eles. Os processos endócrinos que envolvem o hipotálamo, a pituitária e os órgãos subsequentes são geralmente chamados **"eixos"** e são vistos mais utilmente como **unidades funcionais para os propósitos de diagnóstico e tratamento clínico** (Fig. 39.4).

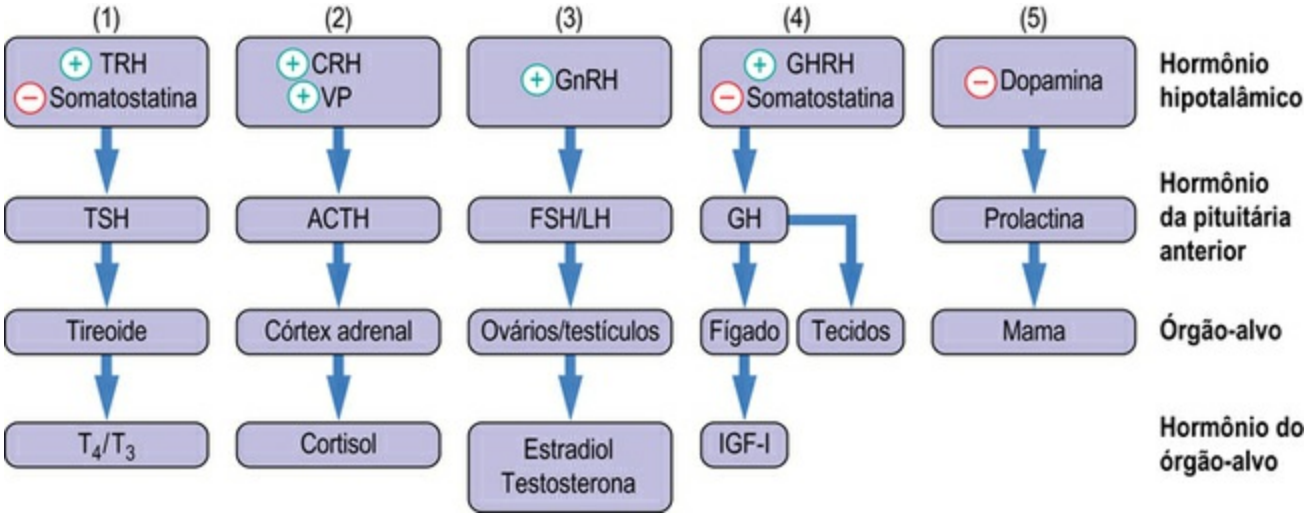


FIG. 39.4 Eixos de órgãos-alvo reguladores do hipotálamo-pituitária anterior. O sistema regulador hipotálamo-pituitária anterior compreende cinco eixos endócrinos paralelos que regulam a biossíntese e a liberação de: **(1)** hormônios tireoidianos; **(2)** glicocorticoides; **(3)** esteroides sexuais; **(4)** hormônio do crescimento e **(5)** prolactina. T_4, tiroxina; T_3, tri-iodotironina; GHRH, hormônio liberador do hormônio do crescimento; GnRH, hormônio liberador de gonadotrofina; IGF-1, fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1; ACTH, hormônio adrenocorticotrófico; FSH, hormônio foliculoestimulante; LH, hormônio luteinizante; TRH, hormônio liberador da tireotrofina; CRH, hormônio liberador de corticotrofina; TSH, hormônio estimulador da tireoide; VP, vasopressina; (+) indica ação estimuladora e (−), ação inibidora.

Hormônios da glândula pituitária posterior

A glândula pituitária posterior secreta dois hormônios na circulação

A **ocitocina** é um pequeno hormônio peptídico que estimula a contração do músculo liso no útero e na mama; ela atua no parto e na lactação. A **vasopressina** (VP), também conhecida como **hormônio antidiurético** (ADH), é um peptídio cíclico de nove aminoácidos que funciona em associação à excreção e à homeostasia da água, e é descrito em detalhe no Capítulo 24. Na VP humana, o aminoácido na posição oito do peptídio é a arginina e, como tal, ela é referida como **arginina-vasopressina (AVP).**

Eixos dos hormônios do sistema regulador hipotálamo-pituitária anterior

Existem cinco eixos endócrinos que passam por esse sistema (Fig. 39.4)

Três deles formam um **sistema endócrino** complexo **de três níveis** no qual os hormônios da glândula pituitária (hormônio tireoestimulante [TSH], hormônio adrenocorticotrófico [ACTH], hormônio foliculoestimulante [FSH] e hormônio luteinizante [LH]) podem ser vistos somente como hormônios tróficos para outros órgãos-alvo (isto é, tireoide, adrenais e gônadas). Nesses eixos, um controle sofisticado é exercido por meio de uma cascata na qual cada órgão endócrino no eixo amplifica tanto a quantidade de hormônio secretado quanto a meia-vida biológica do seu produto hormonal em comparação com o órgão anterior. **O quarto eixo** endócrino é **um híbrido:** o hormônio de crescimento tanto é

um hormônio trófico como apresenta ações por si próprio. **O quinto** e último eixo endócrino medeia a secreção de prolactina, peculiar por **não ser um hormônio trófico**. As síndromes clínicas distintas são produzidas pela deficiência ou pelo excesso de qualquer um dos hormônios da pituitária anterior, exceto a prolactina, cuja deficiência não leva a problemas clinicamente significativos em humanos (Tabela 39.5).

Tabela 39.5

Condições clínicas associadas aos distúrbios do hormônio pituitário

Hormônio	Deficiência	Excesso
TSH	Hipotireoidismo	Tireotoxicose
ACTH	Hipoadrenalismo	Doença de Cushing
FSH/LH	Hipogonadismo	Puberdade precoce
GH	Estatura baixa	Gigantismo/acromegalia
Prolactina	Nenhuma	Galactorreia/infertilidade

O Eixo hipotálamo-pituitária-tireoide

Hormônio liberador de tireotrofina (TRH)

O TRH é sintetizado no hipotálamo e transportado pela circulação portal para a pituitária, onde, por fim, estimula a secreção de TSH

O TRH é um tripeptídio modificado liberado de modo pulsátil pelos núcleos hipotalâmicos peptidérgicos e transportado para a pituitária anterior pela circulação portal. Ele estimula a síntese e a secreção do TSH pela sua ligação a receptores acoplados à proteína G na membrana da célula tireotrófica da pituitária que estão ligados à fosfolipase C. O aumento resultante no inositol trifosfato (IP3) intracelular estimula a liberação do cálcio a partir dos locais de armazenamento e leva, assim, à secreção do TSH pré- -formado. As ações mais crônicas do TRH incluem a estimulação da biossíntese da subunidade do TSH e a glicosilação do TSH. O número de receptores TRH nos tireotrofos é regulado negativamente tanto pela concentração do próprio TRH quanto pelos hormônios tireoidianos.

Hormônio tireoestimulante (TSH)

O TSH, ou tireotrofina, é uma pequena glicoproteína sintetizada pelos tireotrofos pituitários

O TSH consiste em duas subunidades interligadas não covalentemente e contém cerca de 15% de carboidratos. A cadeia α é idêntica àquela encontrada em outros hormônios glicoproteicos (LH, FSH, gonadotrofina coriônica β [βHCG]) e, portanto, a especificidade

é conferida pela cadeia β. A síntese de cada subunidade é realizada a partir de ácidos ribonucleicos mensageiros (mRNAs) diferentes codificados por genes localizados em diferentes cromossomos. As cadeias laterais de carboidratos são misturas complexas de açúcares não modificados, acetilados e sulfatados. O TSH é secretado em um padrão que é tanto pulsátil quanto circadiano e tem uma meia-vida plasmática de cerca de 65 minutos.

O TSH atua na glândula tireoide e influencia aparentemente cada aspecto da biossíntese e da secreção do hormônio tireoidiano

O TSH, assim como o TRH, atua por meio de receptores específicos acoplados à proteína G. No entanto, nesse caso, o receptor é expresso em células foliculares na glândula tireoide e está acoplado à adenil ciclase e, portanto, à proteína cinase A (ou proteína cinase dependente de monofosfato de adenosina cíclico [cAMP]). As proteínas cinases dependentes de cAMP controlam praticamente todos os aspectos da biossíntese e da secreção do hormônio tireoidiano, incluindo o transporte de iodetos, a formação da iodotironina, a proteólise da tireoglobulina e a deiodinação da tiroxina. O TSH também estimula o crescimento da glândula tireoide. De fato, a ativação de mutações somáticas no receptor de TSH é conhecida por ser responsável por muitos casos de **bócio multinodular**, um aumento irregular muito comum da glândula tireoide, particularmente quando associado à secreção excessiva do hormônio tireoidiano.

A retroalimentação negativa pelos hormônios tireoidianos ocorre tanto no nível hipotalâmico quanto no pituitário. Ao nível pituitário, a tiroxina (T_4) e a tri-iodotironina (T_3) inibem a secreção de TSH pelas diminuições da biossíntese e da liberação do TSH mediante a regulação da transcrição gênica e da glicosilação do TSH. A T_3, a forma biologicamente ativa do hormônio, é um inibidor retroativo mais potente do que a T_4 e, na verdade, a maior parte da inibição retroativa pela T_4 requer antes sua conversão intracelular para T_3 pela deiodinase tipo 2.

Tiroxina e tri-iodotironina

A T_4 é produzida exclusivamente na glândula tireoide e é mais abundante do que a T_3, que é a forma biologicamente ativa

A tiroxina (também conhecida como tetraiodotironina) e a T_3 são moléculas estruturalmente simples, sendo tironinas iodinadas produzidas pelo acoplamento de um grupo fenila obtido a partir de uma tirosina ao grupo fenila de outra tirosina intacta (Fig. 39.5). A biossíntese de T_4 e T_3 ocorre na superfície da **tireoglobulina**, uma glicoproteína grande rica em tirosina e responsável por cerca de 75% do conteúdo proteico da glândula tireoide. A iodinação (ou iodetação) da tireoglobulina ocorre após ela ter sido secretada para o lúmen folicular, e a secreção de T_4 e T_3 requer a hidrólise enzimática da tireoglobulina, que está localizada no coloide folicular. Durante a hidrólise e a subsequente deiodinação, o iodeto liberado é conservado e reutilizado (Fig. 39.6).

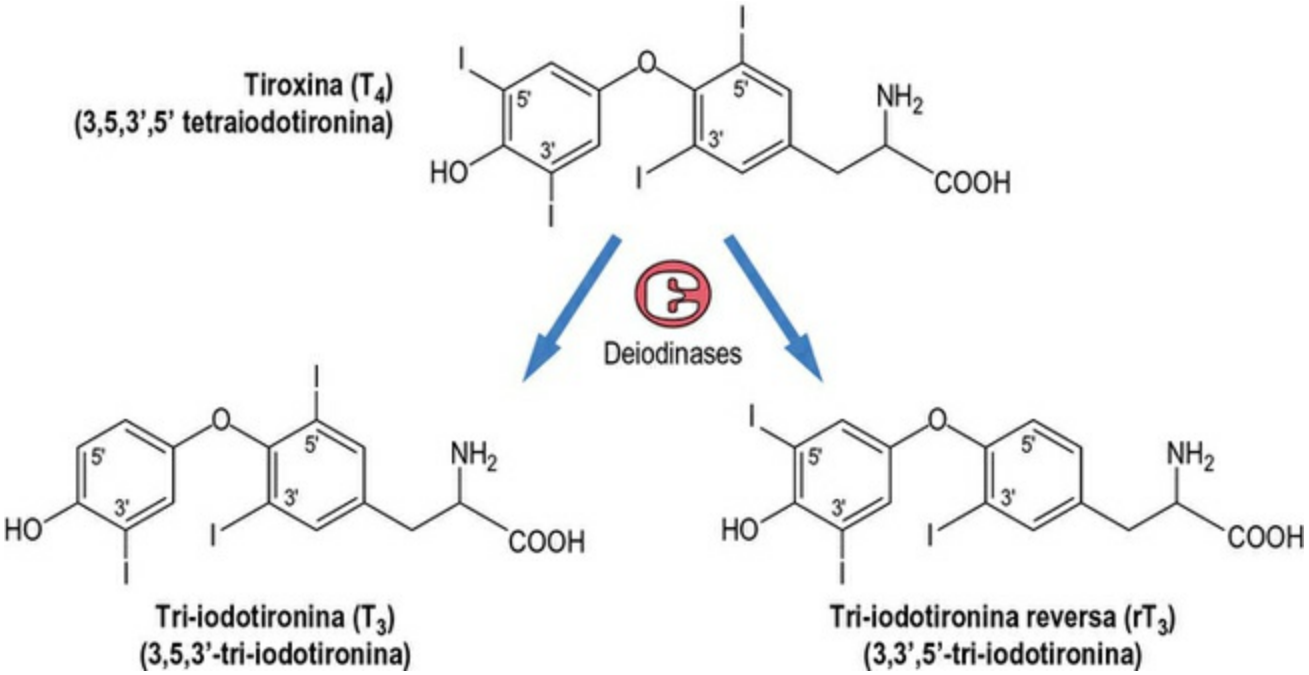


FIG. 39.5 Estruturas dos hormônios tireoidianos tiroxina (T_4), tri-iodotironina (T_3) e T_3 reversa (rT_3).

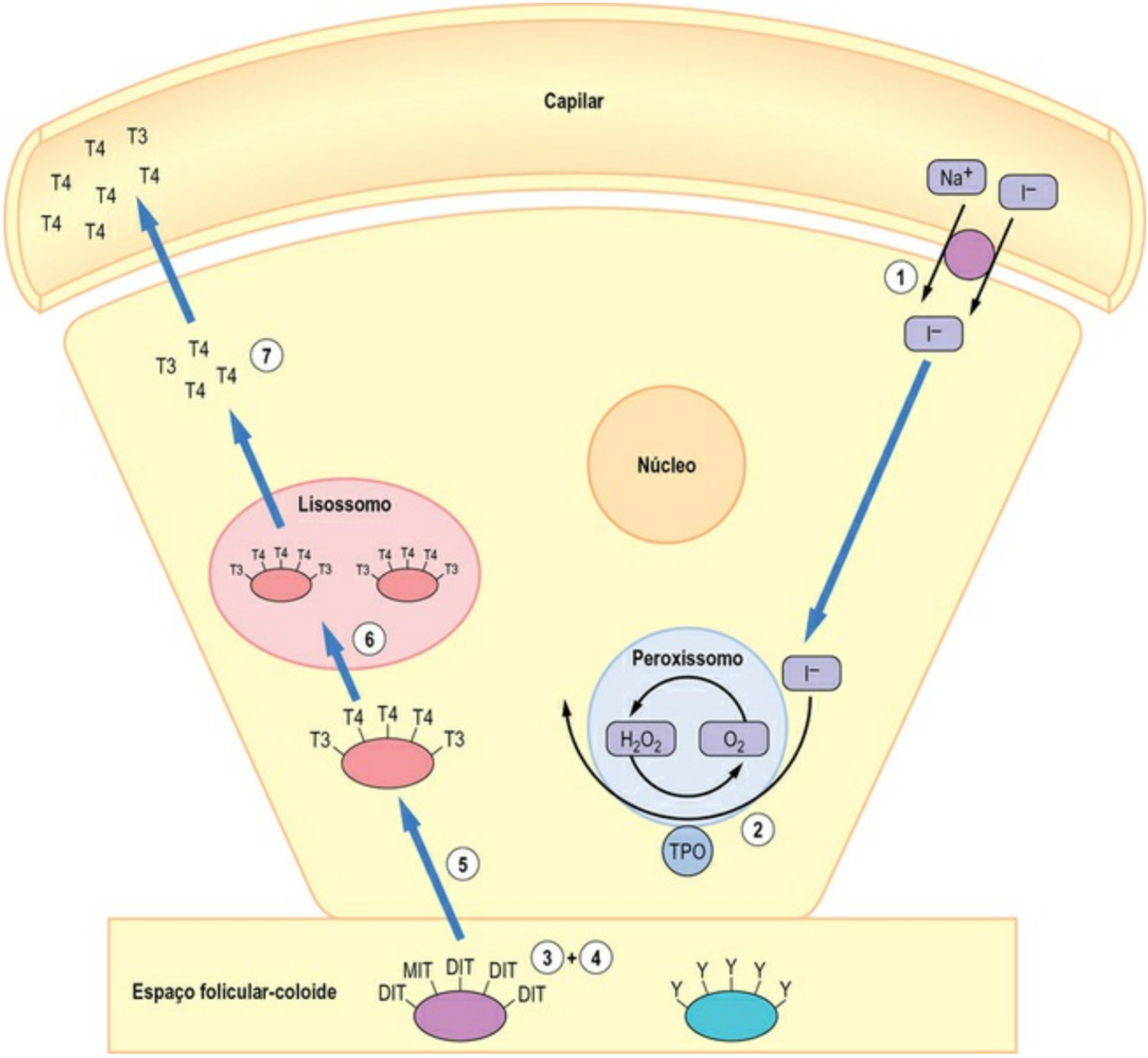


FIG. 39.6 Mecanismo da biossíntese dos hormônios tireoidianos. **(1)** O iodeto é concentrado nas células epiteliais foliculares após a entrada por meio de um simportador de sódio e iodeto, antes da **(2)** oxidação pela tireoperoxidase (TPO) no peroxissomo para iodo. **(3, 4)** Na membrana plasmática, adjacente ao lúmen folicular, ocorre a conversão de resíduos tirosil (Y) na superfície da tireoglobulina, tanto para a monoiodotirosina (MIT) quanto para di-iodotirosina (DIT). Há então o acoplamento das tirosinas iodinadas para formar T_4 (DIT + DIT) ou T_3 (MIT + DIT). **(5)** A tireoglobulina é endocitada e **(6)** hidrolisada nos lisossomos para liberar T_3 e T_4 livres. **(7)** Os hormônios tireoidianos são transportados para a membrana plasmática e liberados na corrente sanguínea por mecanismos que ainda não estão claros. O TSH influencia aparentemente cada etapa da síntese dos hormônios tireoidianos e da liberação por meio da via cAMP/proteína cinase A.

A bioatividade do hormônio tireoidiano é regulada pelo controle da conversão de T_4 em T_3 pela deiodinação, a qual é mediada por **três enzimas deiodinases**.

Entre 80-95% do hormônio tireoidiano secretado pela glândula tireoide são de T_4, com T_3 sendo o componente minoritário

Contudo, a **T_3** produzida pela deiodinação 5′ da T_4 é a **forma biologicamente ativa**, e a T_4 pode ser vista como um pró- -hormônio. A deiodinação 5′ pode ocorrer na glândula tireoide, em tecidos-alvo ou em outros tecidos periféricos, sendo realizada pelos tipos iodotironina deiodinases 1 e 2 (DI1 e DI2). A enzima tipo 2 é particularmente importante

no controle dos níveis nucleares de T_3, enquanto o papel fisiológico da deiodinase tipo 1, cineticamente ineficiente, não está claro até agora. A enzima tipo 3 é a principal enzima catabólica; ela catalisa a remoção de um iodeto da posição 3 em vez da posição 5', resultando em uma **T_3 reversa** (rT_3), que é inativa e deiodiniza e inativa similarmente a T_3. Assim, o controle da deiodinação da T_4 é um meio de controlar a bioatividade do hormônio tireoidiano. Cerca de 80% da T_4 são metabolizados por deiodinação, com quantidades quase iguais de T_3 e rT_3 sendo produzidas. A T_4 restante é conjugada ao sulfato ou ao ácido glicurônico e desativada por desamidação ou descarboxilação. Em doenças graves existem boas evidências de que a ativação de T_4 para T_3 pela DI1 e DI2 está prejudicada, enquanto a expressão de DI3 está aumentada. Isso resulta em níveis baixos de T_3, o que é uma característica precoce da chamada **"síndrome do eutireoidiano doente"**.

A fração biologicamente ativa de T_3 e T_4 no plasma (T_3 e T_4 livres, isto é, a fração que não está ligada a proteínas) representa, em cada caso, menos de 1% da concentração total do hormônio

A produção diária de T_4 é aproximadamente 10% do conjunto extratireoidiano, a maior parte ligada à TBG ou à albumina no plasma. Aproximadamente 80% dessa T_4 são convertidos em T_3 pela deiodinação extratireoidiana. A reposição da T_3 é muito maior do que a de T_4. A fração biologicamente ativa de T_4 e de T_3 no plasma é a fração livre – não ligada a proteínas. Essa fração, que é uma medida do estado de hormônio tireoidiano, representa menos de 1% do total de T_4 e T_3. A maioria dos laboratórios clínicos analisa agora os níveis de hormônio livre especificamente para evitar problemas na interpretação dos níveis totais do hormônio causados pelas flutuações nas proteínas ligantes.

Ações bioquímicas dos hormônios tireoidianos

Os hormônios tireoidianos podem ser considerados o pedal acelerador do metabolismo

A T_3 aumenta a taxa metabólica de amplo grupo de tecidos e por isso eleva a **taxa metabólica basal** do corpo inteiro. A maioria dessas ações resulta da ligação da T_3 a seus receptores nucleares α e β, que são codificados por genes separados (Cap. 40), e da alteração nas taxas de transcrição dos genes nos tecidos-alvo. Entre as muitas alterações celulares que resultam desse programa alterado de expressão gênica, foi mostrado que os hormônios tireoidianos **aumentam a utilização de trifosfato de adenosina (ATP)** pela elevação na atividade da ATPase (Na^+/K^+)-dependente e **aumento do metabolismo oxidativo mitocondrial**, em parte pela regulação positiva direta dos fatores-chave da biogênese mitocondrial. A lipólise do tecido adiposo também é estimulada pela ativação, dependente de cAMP, da lipase sensível ao hormônio, liberando assim ácidos graxos que podem ser oxidados para gerar o ATP usado para a **termogênese**. Aumentos na

glicogenólise e na gliconeogênese ocorrem para balancear o uso elevado de glicose como um combustível da termogênese. A taxa de síntese de muitas proteínas estruturais, enzimas e outros hormônios também é afetada como resultado da ação do hormônio tireoidiano, e a "transcriptômica" baseada em microarranjos (Cap. 36) agora pode ser usada para definir as muitas centenas ou milhares de genes cuja expressão é alterada pela ativação do receptor do hormônio tireoidiano.



Quadro de conceitos avançados

Transportadores de membrana para o hormônio da tireoide

Tradicionalmente, pensava-se que os hormônios lipofílicos, como os esteroides e os hormônios da tireoide, se difundiam simplesmente através das bicamadas lipídicas para atingirem seus receptores intracelulares. No entanto, nos últimos anos, demonstrou-se que a **proteína de membrana plasmática MCT8 funciona como um receptor do hormônio da tireoide** e que a deficiência genética da proteína conduz a **retardo psicomotor** grave e a elevadas razões T_3/T_4. Os pacientes afetados não têm as manifestações periféricas do hipotireoidismo, contudo. Desde esta descoberta foram identificados vários transportadores de hormônios da tireoide e permanece, como questão interessante, se outros hormônios lipofílicos também têm mecanismos similares e específicos a governar a entrada na célula.

Distúrbios clínicos da função tireoidiana

A doença da tireoide é comum, afetando quase 3% da população; as mulheres são nove vezes mais afetadas do que os homens

Mais de 95% das doenças tireoidianas se originam na glândula tireoide, e a maioria delas é de origem **autoimune**. Os anticorpos podem surgir contra diversos componentes das células tireoidianas, incluindo os microssomos ricos em peroxidase. Ocorrem a infiltração de linfócitos e a destruição progressiva da glândula tireoide, levando ao **hipotireoidismo**, o tipo mais comum de disfunção tireoidiana. Alguns autoanticorpos contra a tireoide se ligam ao receptor TSH. Se os autoanticorpos se ligam, mas não estimulam a glândula, a produção do hormônio tireoidiano diminui e o paciente se torna hipotireóideo (ou hipotireoideu), com aumento do TSH plasmático e redução na T_4 livre. No entanto, se os autoanticorpos se ligam e a estimulam, eles mimetizam o efeito do TSH, interrompendo a alça de retroalimentação negativa normal, produzindo uma secreção tireoidiana excessiva, e o paciente estará **hipertireóideo** (hipertireoideu; **tireotóxico**) com a T_4 livre plasmática aumentada e o TSH suprimido.



Quadro de conceitos avançados

Uma história de duas síndromes de resistência ao hormônio da tireoide

O hormônio tireoidiano exerce seus efeitos celulares por meio de alterações na expressão gênica mediadas por dois receptores nucleares diferentes, os receptores do hormônio da tireoide α e β (TRα e TRβ). O TRα é a isoforma dominante no osso, no trato gastrintestinal (GI) e nos músculos cardíaco e esquelético, enquanto o TRβ predomina no fígado, nos rins e em partes do hipotálamo. De acordo com isso, foram descritos defeitos genéticos tanto no TRα quanto no TRβ. Os defeitos no TRβ são muito mais comuns e causam **elevados níveis de hormônios da tireoide, com TSH detectável**. Os defeitos no TRα, descritos muito recentemente, produzem, pelo contrário, maturação esquelética retardada, obstipação e retardo mental ligeiro, associados a um **TSH normal e a uma elevada razão T_3/T_4** (ver Bochukova et al. *A mutation in the thyroid hormone receptor α gene.* N Engl J Med. 2012;19:366:243–239 e Beck-Peccoz P. Syndromes of thyroid hormone resistance. Ann Endocrinol (Paris). 2005;66:264-269).

As causas hipotalâmicas e hipofisárias do hipotireoidismo são frequentemente resultado da secreção prejudicada de TSH consequente à pressão de um **tumor** adjacente. Os tumores pituitários secretores de TSH são uma causa extremamente rara de hipertireoidismo e frequentemente produzem razões altamente anormais da subunidade α sobre a subunidade β do TSH e padrões anormais de glicosilação do TSH, o que pode ser útil no diagnóstico.

O Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal

Hormônio liberador de corticotrofina (CRH)

O CRH é um peptídio de 41 aminoácidos secretado pelo núcleo paraventricular (PVN)

O CRH se liga ao receptor acoplado à proteína G das células corticotróficas da pituitária atuando por meio do segundo mensageiro do sistema, o cAMP, que estimula tanto a síntese quanto a secreção do ACTH. Um segundo hormônio do PVN, a vasopressina, potencializa a resposta da pituitária ao CRH, em parte pelo aumento na quantidade e na extensão da expressão do receptor do CRH. A retroalimentação negativa pelo cortisol inibe tanto a secreção do CRH quanto da VP, assim como reduz a responsividade dos corticotrofos à estimulação.



Quadro clínico

Mulher de 60 anos com ganho de peso, intolerância ao frio e fadiga: hipotireoidismo

Uma mulher de 60 anos vem à clínica reclamando de ganho de peso, intolerância ao frio e fadiga. Ela também diz que recentemente se tornou menos alerta mentalmente, mas atribui isso à idade. Ao ser questionada, admite que também tem sofrido de constipação grave ultimamente. Ela relata que dois membros da sua família tiveram "problemas tireoidianos". Ao exame, está moderadamente obesa, tem pele seca e fria, face inchada e taxa cardíaca lenta de 50 batimentos por minuto. A glândula tireoide não é palpável. Sua tiroxina livre (T_4) estava em 5 pmol/l (0,4 ng/dl) (faixa de referência 9-25 pmol/l [0,7-2 ng/dl]) e o TSH era de 60 mU/l (faixa de referência: 0,4-4 mU/l).

Comentário

Os sintomas do hipotireoidismo em estágio inicial podem ser bastante inespecíficos. O melhor teste de laboratório para o diagnóstico de hipotireoidismo é a medição da concentração plasmática de TSH. O nível elevado de TSH sugere distúrbio primário da tireoide. Subsequentemente, o sangue dessa senhora mostrou ser positivo para anticorpos antimicrossomais e antitireoglobulina. Um diagnóstico de **tireoidite linfocítica (tireoidite de Hashimoto)** foi definido. Ela foi tratada com tiroxina.



Quadro clínico

Mulher de 35 anos reclamando de palpitações e fadiga: hipertireoidismo

Uma mulher de 35 anos veio ao seu médico reclamando de palpitações, dificuldade de subir escadas e fadiga generalizada. Também disse que perdeu 4 kg recentemente, a despeito do bom apetite e de nenhuma tentativa de dieta. Relatou diarreia ocasional e sangramentos menstruais ocasionais e leves, cada vez mais frequentes.

Ao exame, sua pele estava quente e úmida e ela tinha tremores leves das mãos quando estendidas. Apresentava fraqueza leve dos músculos da coxa e taquicardia (110/min). Tinha aumento brando da tireoide (bócio, papeira) e uma proeminência sobre a glândula. Testes da função tireoidiana mostraram nível suprimido de TSH (< 0,05 mU/l; faixa de referência 0,4-4 mU/l) e tiroxina (T_4 = 41 pmol/l [3,3 ng/dl]; faixa de referência 9-25 pmol/l [0,7-2 ng/dl]) e tri-iodotironina (T_3 = 17 pmol/l [1.105 pg/dl]; faixa de referência 3,5-6,5 pmol/l [228-422 pg/dl]) aumentadas. Anticorpos contra receptores tireoidianos foram detectados.

Comentário

No hipertireoidismo, o nível de TSH é suprimido pelos altos níveis de hormônios tireoidianos circulantes. O nível baixo de TSH e as concentrações altas do hormônio tireoidiano sugerem hipertireoidismo. A presença de anticorpos para receptores tireoidianos confirma que a causa é a **doença de Graves, um distúrbio tireoidiano autoimune.**



Quadro de conceitos avançados

O gerador de pulsos de GnRH e a genética humana

O eixo hipotalâmico-pituitário-gonadal é ativo durante os primeiros meses de vida antes de ser desligado, entrando em um estado quiescente até ser reativado na puberdade. Existem diversas linhas de evidência sugestivas de que isso é largamente determinado ao nível central, e um grupo de neurônios hipotalâmicos vagamente definido, conhecido como "gerador de pulsos" de GnRH, é o principal foco de interesse. Estudos genéticos humanos ao longo da última década, combinados com estudos em ratos geneticamente modificados, originaram, porém, algumas noções-chave, e sabe-se agora que os **neuropeptídios kisspeptina e neuroquinina B** são criticamente requeridos para a normal **maturação da secreção de GnRH**, sendo que os defeitos genéticos nos genes codificantes quer da kisspeptina, da neuroquinina B ou de qualquer um de seus receptores levam à ausência ou ao grave comprometimento da maturação. Está sendo agora dedicado muito trabalho à compreensão do comportamento de um grupo de neurônios que se encontram intimamente apostos aos neurônios GnRH, e que coexpressam a kisspeptina, a neuroquinina e também a dinorfina, já que esses neurônios possuem conexões e propriedades que sugerem que eles poderão fazer parte integrante do indefinido gerador de pulsos de GnRH.

Hormônio adrenocorticotrófico (ACTH)

O ACTH é sintetizado com uma molécula precursora de 241 aminoácidos, a pró-opiomelanocortina (POMC)

A POMC é clivada em múltiplos sítios para liberar vários peptídios hormonalmente ativos, incluindo as **endorfinas** e os **hormônios estimuladores dos melanócitos.** Excluindo a pituitária, a POMC também pode ser produzida em grande quantidade por certos tipos de câncer, dando origem à **síndrome ectópica de produção de ACTH.**

O ACTH é composto de 39 aminoácidos com a atividade biológica residindo nos 24 resíduos *N*-terminais

O ACTH é secretado em picos de estresse superpostos com um ritmo diurno acentuado, ou seja, um rápido aumento de produção desde cerca das 3 horas e uma concentração plasmática máxima por volta das 5 horas. Ele é transportado livre no plasma e tem meia-vida de cerca de 10 minutos. O ACTH estimula a síntese e a liberação dos hormônios glicocorticoides pela interação com receptores de superfície em células do córtex adrenal acoplados à proteína G, que, por sua vez, estimula a produção de cAMP. Aumentos agudos na síntese adrenal de cortisol ocorrem em 3 minutos, principalmente pela estimulação da atividade da colesterol esterase. Os efeitos em longo prazo do ACTH incluem a indução da transcrição dos genes que codificam as enzimas esteroidogênicas e a manutenção das *zonas fasciculada* e *reticular* da glândula, significando que a falta prolongada de ACTH eventualmente abole a capacidade da glândula de responder a um desafio agudo para indução de aumento da síntese de cortisol e androgênios (Cap. 17).

A retroalimentação negativa pelo cortisol ocorre em dois espaços de tempo, atuando

tanto em nível hipotalâmico quanto pituitário. A **retroalimentação rápida** altera a liberação do CRH hipotalâmico e a secreção de ACTH mediada por CRH. A **retroalimentação lenta** resulta da síntese reduzida do CRH mais a supressão da transcrição gênica da POMC, que resulta na síntese reduzida de ACTH.

Biossíntese do cortisol

No homem, o cortisol é o principal glicocorticoide, sintetizado no córtex adrenal e está sob o controle direto do ACTH pituitário

Um esquema simplificado da biossíntese de esteroides é mostrado na Figura 39.7 (ver também a Figura 17.12). O **colesterol** é o precursor de todos os hormônios esteroides. A clivagem da cadeia lateral do colesterol libera os **corticosteroides C-21**; clivagens adicionais dessa cadeia lateral produzem os **androgênios C-19** e a aromatização do anel A resulta nos **estrogênios C-18**. As estruturas dos hormônios esteroides-chave são mostradas no Capítulo 17. Várias das enzimas esteroidogênicas são membros da superfamília de oxidases do citocromo P-450.

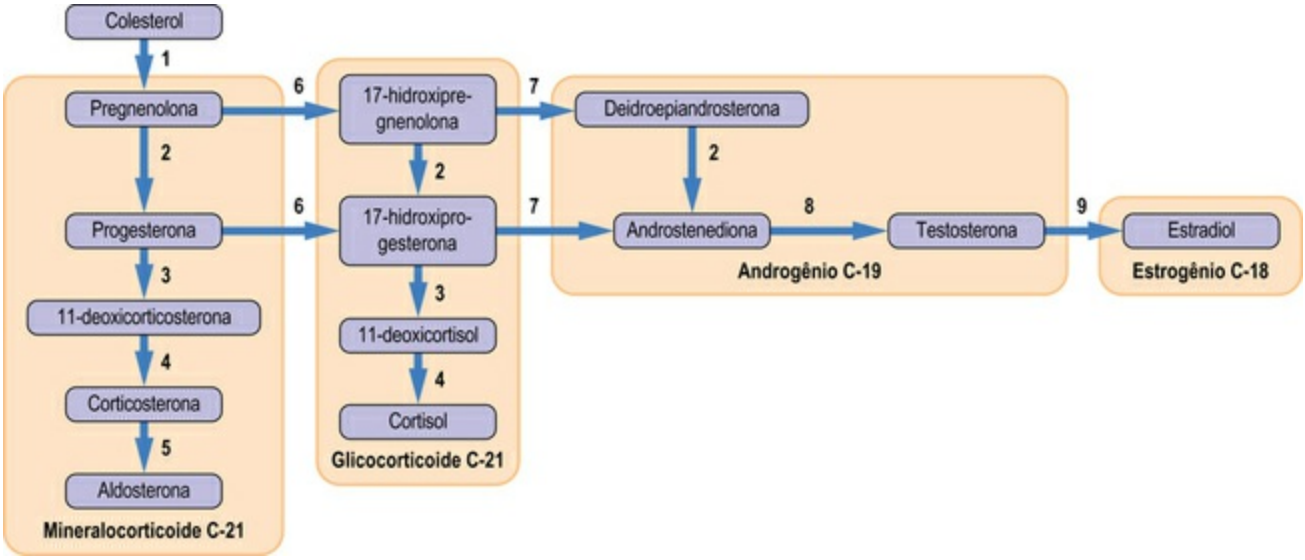


FIG. 39.7 Resumo da biossíntese dos hormônios esteroides. **(1)** colesterol 20,22 desmolase; **(2)** 3β-hidroxiesteroide desidrogenase $\Delta\alpha^{4,5}$-oxoesteroide isomerase; **(3)** 21-hidroxilase; **(4)** 11-hidroxilase; **(5)** aldosterona sintase; **(6)** 17α-hidroxilase; **(7)** 17,20-liase/desmolase; **(8)** 17β-hidroxiesteroide desidrogenase; **(9)** aromatase. Essas enzimas fazem parte da superfamília das mono-oxigenases citocromo P450 dependentes de NADPH (Cap. 30; compare com as Figuras 17.11 e 17.12).

A concentração plasmática do **cortisol** mostra um **ritmo diurno** pronunciado, sendo cerca de 10 vezes maior às 8 horas do que às 24 horas. Isso acompanha o ritmo diurno marcante da secreção do ACTH. Aproximadamente 95% do cortisol no plasma estão ligados a proteínas, principalmente a **globulina ligante de cortisol** (CBG). À medida que a concentração do cortisol aumenta, o percentual de cortisol livre também aumenta, indicando que a ligação à CBG é saturável. O cortisol tem uma meia-vida no plasma de cerca de 100 minutos. Ele é metabolizado no fígado e em outros órgãos pela combinação

de redução, clivagem das cadeias laterais e conjugação, dando origem a um grande número de metabólitos inativos que são excretados na urina (Fig. 17.13).

O cortisol tem diversos efeitos no metabolismo e no crescimento e reparo dos tecidos

O cortisol tem ampla faixa de efeitos no metabolismo, na função imunológica, no sistema cardiovascular e no esqueleto, mediados pelas alterações nos níveis de expressão de milhares de genes. Como o nome glicocorticoide sugere, o cortisol tem grande influência na **homeostase da glicose**: ele é um hormônio contrarregulador, trabalhando por meio de receptores nucleares para induzir a biossíntese das enzimas gliconeogênicas e, ao mesmo tempo, inibir a captação de glicose e o seu uso pelos tecidos periféricos. A síntese e a deposição de glicogênio estão aumentadas e a lipólise, estimulada no tecido adiposo. As sínteses de proteína e RNA são estimuladas no fígado, mas inibidas nos músculos; a proteólise no músculo gera os aminoácidos substratos para a gliconeogênese hepática. O cortisol atua em conjunto com diversos outros hormônios, incluindo a insulina e o GH, na regulação do metabolismo intermediário, e seus efeitos metabólicos são mais bem compreendidos como parte de uma **resposta endócrina ao estresse fisiológico** (Cap. 21).

O **cortisol também modula o sistema imunológico** mediante os efeitos na produção de citocinas e o aumento da apoptose de leucócitos, efeitos que são explorados farmacologicamente no **uso de glicocorticoides potentes para tratar doenças inflamatórias**. Além disso, ele é permissivo, favorecendo o efeito de vários vasoconstritores, como as **catecolaminas**, apresenta efeitos diretos no coração e nos rins, onde acentua a eliminação de água e a reabsorção de eletrólitos, e nos ossos, influenciando a sua reposição por intermédio de uma variedade de mecanismos.

Distúrbios clínicos da secreção de cortisol

A hipossecreção de cortisol pode ocorrer como resultado das falências do hipotálamo, da pituitária ou da adrenal

O diagnóstico da deficiência de cortisol e de sua causa depende da apresentação clínica, da dosagem cuidadosamente calendarizada do cortisol e do ACTH e do grau de resposta de cortisol ao ACTH sintético (Synacthen®).

A **doença de Addison** se refere especificamente à falha adrenal primária, na qual a secreção de todos os hormônios adrenais se encontra diminuída, geralmente devido a doença autoimune ou infecção (p. ex., por tuberculose ou citomegalovírus). Bioquimicamente, é caracterizada por sódio sérico baixo, elevado potássio sérico, acidose e resposta de cortisol comprometida com o ACTH sintético (Synacthen®), juntamente com um elevado ACTH plasmático. A substituição de cortisol, geralmente combinada com um mineralocorticoide, é um tratamento eficaz para esta condição potencialmente fatal. **A doença de Addison pode estar associada a um TSH acentuadamente elevado, que se resolve com terapia glicocorticoide**. É importante reconhecer isso, já que o diagnóstico errôneo de hipotireoidismo primário e o tratamento com tiroxina podem

exacerbar perigosamente os sinais e os sintomas do hipoadrenalismo.

As **deficiências de CRH e de ACTH** são isoladas apenas raramente e são mais comumente acompanhadas de deficiências de outros hormônios hipotalâmicos ou pituitários devido, por exemplo, a um tumor pituitário compressivo. Uma vez que os glicocorticoides estão também envolvidos na excreção normal de água, sua deficiência pode mascarar uma carência de ADH coexistente, e a substituição leva à diurese pronunciada.

A hipossecreção de cortisol pode também resultar de um distúrbio genético na via biossintética dos esteroides: hiperplasia adrenal congênita

A enzima mais frequentemente afetada é a **esteroide 21- hidroxilase** (Fig. 39.7). Na deficiência quase completa da enzima, a deficiência de cortisol e de aldosterona acarreta a perda de **sais, levando à hiponatremia nos primeiros dias de vida**, uma apresentação grave fácil de reconhecer. Devido à perda da retroalimentação negativa pelo cortisol, os níveis de ACTH aumentam na tentativa de oferecer quantidades maiores do substrato 17-hidroxiprogesterona (17OHP) para contornar o bloqueio enzimático. Contudo, a 17OHP é também convertida em androgênios, e a superprodução deles pode masculinizar a genitália feminina externa antes do nascimento. Defeitos parciais na enzima podem ser compensados por níveis circulantes elevados de ACTH, suficientes para manter os níveis de cortisol, embora a produção de metabólitos próximo à enzima defeituosa na via ainda ocorra. Consequentemente, isso se apresenta em meninas adolescentes como **hirsutismo** (crescimento de tipo e distribuição de pelos masculinos na mulher) e **irregularidade menstrual**. O perfil de esteroides de um paciente com hiperplasia adrenal congênita é dado na Figura 17.13.

A hipersecreção do cortisol resulta na síndrome de Cushing – o mais desafiador dos distúrbios endócrinos

Os glicocorticoides exógenos, comumente receitados para suprimir o sistema imune em uma série de doenças inflamatórias, são as causas mais comuns da **síndrome de Cushing**, no entanto esta síndrome também pode resultar de distúrbios do hipotálamo, da glândula pituitária (cerca de 80%) ou adrenal (cerca de 15%), ou pode ser consequência da síndrome ectópica do ACTH. O excesso de cortisol leva à redistribuição do tecido adiposo, com deposição de gordura na face e no tronco, e à perda de gordura nos membros, perda de músculo esquelético, afinamento da pele e cicatrização lenta (Fig. 39.8). O excesso de cortisol também produz comumente o **diabetes** e a **hipertensão** e geralmente suprime o eixo hipotalâmico-gonadal, visto como **perda da menstruação** nas mulheres.



FIG. 39.8 Síndrome de Cushing devido a hipersecreção de cortisol.
São apresentadas "estrias" lívidas causadas pelo enfraquecimento do tecido conjuntivo dérmico aliado a tecido adiposo abdominal aumentado.

Quadro clínico

Mulher de 40 anos após um desmaio em casa: a insuficiência adrenal primária é uma emergência endócrina

Uma mulher de 40 anos foi socorrida na emergência médica após um desmaio em casa dois dias após contrair gripe. Por um ano ela se queixou de fraqueza crônica e fadiga e, ultimamente, de dor abdominal, náusea, vômito, anorexia e confusão mental. Ela esteve desidratada e hipotensiva com pigmentação das dobras palmares e da mucosa bucal. A análise bioquímica revelou Na^+ de 115 mmol/l (135-145 mmol/l); K^+ de 5,9 mmol/l (3,5-5 mmol/l); ureia, 12 mmol/l (2,5-6,5 mmol/l) e glicose, 2,9 mmol/L (4-6 mmol/l). O cortisol sérico basal era de 55 nmol/l (2 ug/dl) e não aumentou adequadamente 30 minutos após a administração de ACTH sintético (Synacthen®).

Comentário

Essa é uma apresentação aguda da **doença de Addison** resultante da **destruição autoimune** progressiva **do córtex adrenal**. Os sintomas não específicos da deficiência de cortisol se tornaram críticos após o estresse de pequena doença mínima. A hipotensão e o desequilíbrio eletrolítico resultam da deficiência de mineralocorticoides. A pigmentação é relativa ao elevado ACTH e a outros peptídios derivados da POMC, como os hormônios estimuladores dos melanócitos. O diagnóstico é obtido pela **resposta deficiente de produção de cortisol ao ACTH sintético.** O tratamento é a reidratação salina intravenosa mais uma dose grande

(*bólus*) de hidrocortisona intravenosa seguida de terapia de manutenção diária com hidrocortisona e um mineralocorticoide. Outras doenças autoimunes coexistem comumente no paciente ou em sua família. **A frequência aumentada da hipoglicemia grave nos pacientes com o diabetes do tipo 1** é uma ocorrência a ser vigiada por causa da perda dos efeitos contrarregulatórios da glicose pelo cortisol.

O diagnóstico da síndrome de Cushing pode ser extremamente exigente por diversas razões

Por causa da variação circadiana pronunciada nos níveis séricos de cortisol, a medição randômica do cortisol é de pouca utilidade no diagnóstico da síndrome de Cushing. Em seu lugar, o cortisol urinário livre de 24 horas, que fornece uma medida da produção total de cortisol ao longo de um dia, é o teste mais comum. Um perfil circadiano anormal da secreção de cortisol, com níveis significativos sustentados à noite, quando estes geralmente são quase indetectáveis, pode produzir a síndrome de Cushing, mesmo que haja pequeno ou mesmo nenhum aumento na produção diária total do cortisol. Isso pode ser detectado pela dosagem do cortisol às 9 horas e à meia-noite, mostrando a **perda do ritmo circadiano normal**. Se o teste for realizado cuidadosamente sem provocar resposta endócrina ao estresse pela coleta do sangue, ele pode ser um meio sensível de detectar o hipercortisolismo.



Quadro clínico

Uma mulher com fadiga e rápido ganho de peso: a síndrome de cushing pode causar um dilema diagnóstico

Uma mulher de 45 anos apresentou fadiga, ganho rápido de peso com obesidade central, estufamento e vermelhidão da face (conhecida como **"pletora"**) e perda dos períodos menstruais regulares. Ela estava levemente hipertensiva e o médico de família também a diagnosticou como diabética, motivo pelo qual ela recebeu aconselhamento alimentar. O cortisol urinário livre era de 1.000 nmol/24h (38 ug/dL) (faixa de referência < 250 nmol/24h [< 9 ug/dL/24h]); o cortisol sérico era de 500 nmol/L às 24 horas (faixa de referência < 50 nmol/L) e seu cortisol às 8 horas era de 550 nmol/L (20,9 ug/dl) após 1 mg de dexametasona (um potente glicocorticoide sintético) (faixa de referência < 50 nmol/L) (< 1,8 ug/dL). O ACTH plasmático era de 100 ng/L (faixa de referência < 80 ng/L).

Comentário

Essa mulher tinha **hipercortisolismo, conhecido como síndrome de Cushing**. O cortisol elevado na urina, o cortisol sérico elevado à meia-noite e a falha na supressão após a administração de dexametasona sustentam o diagnóstico. O resultado do ACTH indica que a causa é um tumor da pituitária (mais provavelmente) ou uma secreção ectópica de ACTH de um tumor oculto. Nesse caso, a **ressonância magnética** (IRM) da pituitária

revelou um **tumor** claro de 0,5 cm de diâmetro; o diagnóstico da síndrome de Cushing e a localização do problema não são frequentemente tão fáceis! A **cirurgia da pituitária** é o tratamento definitivo apropriado nesse caso.

A síndrome endógena de Cushing geralmente surge a partir de tumores secretórios autonomamente funcionais

Alguns dos desafios no diagnóstico da síndrome de Cushing surgem do comportamento variável desses tumores durante sua evolução. Algumas vezes, somente uma hipersecreção episódica de cortisol é observada, com testes de resultado normal entre os episódios, e às vezes a expressão de receptores aberrantes devido a mutações somáticas significa que os níveis do cortisol são secretados em resposta a outros hormônios, como os peptídios derivados do intestino.

Uma vez que os problemas de teste foram superados e o excesso de cortisol circulante demonstrado, o sítio anatômico do problema pode ser investigado utilizando-se uma série de testes que podem incluir **medições do ACTH, cateterização venosa seletiva da pituitária ou das glândulas adrenais e testes de supressão da produção de ACTH pela dexametasona (um glicocorticoide sintético)**. O princípio desse teste de supressão é que os tumores que se tornaram autônomos não exibirão supressão completa normal da atividade secretora por meio de uma dose de glicocorticoide potente. O tratamento definitivo é geralmente cirúrgico e deve ser orientado para a causa primária da doença. Antes, alguns meios médicos para a redução da síntese do cortisol são geralmente utilizados na preparação para a cirurgia.

O Eixo hipotálamo-pituitária-gônadas

Hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH)

O GnRH é essencial para a secreção do FSH (hormônio foliculoestimulante) e do LH (hormônio luteinizante) intactos

O hipotálamo tem um papel predominante no controle da função das gônadas tanto em homens quanto em mulheres, atuando via secreção de GnRH. O GnRH é um decapeptídio sintetizado por vários **núcleos hipotalâmicos** e secretado por um número relativamente pequeno de neurônios no sistema porta para transferência para a pituitária. Os neurônios GnRH servem, portanto, como uma conduta razoavelmente estreita para a transmissão de sinais reprodutivos centrais e são vulneráveis a muitos tipos de patologia. A secreção de GnRH é **altamente pulsátil** e induz a síntese e a secreção tanto do **FSH** quanto do **LH**. A secreção de GnRH é mantida quiescente entre a infância e a puberdade. A frequência e a amplitude aumentadas dos pulsos hipotalâmicos do GnRH são o primeiro estágio mensurável do início da puberdade. Sua liberação está sujeita à retroalimentação negativa pela progesterona, prolactina e, algumas vezes, estrogênio, entre outros hormônios. O GnRH atua por intermédio de seu receptor de superfície celular para aumentar o cálcio intracelular, hidrolisar os fosfoinositídios e ativar a

proteína cinase C. Os agonistas do GnRH de ação prolongada também podem causar uma regulação negativa dos receptores de GnRH, levando a uma secreção diminuída de FSH e LH. Esses agonistas são utilizados atualmente para tratar **câncer de próstata** e para preparar mulheres inférteis para **programas de concepção assistida**.

Quadro de conceitos avançados

Crescimento e longevidade humanos

Embora os defeitos genéticos na ação da GH ou do IGF-1 levem a um comprometimento sério do crescimento, estudos em muitos organismos experimentais sugerem que a reduzida sinalização IGF-1 pode aumentar o tempo de vida. Estudos recentes no Equador, em indivíduos afetados pelo nanismo tipo Laron, devido à mutação do receptor GH, sugeriram que isso pode também ser verdadeiro para humanos, já que, apesar de sua baixa estatura, aqueles com defeitos nos receptores GH pareciam ser protegidos contra diabetes, câncer e tinham biomarcadores de envelhecimento melhorados. (Ver Guevara-Aguirre J et al. *Growth hormone receptor deficiency is associated with a major reduction in pro-aging signaling, cancer, and diabetes in humans*. Sci Transl Med 2011;3:70ra13.)

Hormônio foliculoestimulante e hormônio luteinizante

Embora o FSH e o LH tenham recebido nomes com base em suas funções na mulher, são também secretados e funcionam nos homens

O FSH e o LH são secretados tanto no homem quanto na mulher sob a influência do GnRH, e alterações na frequência e na amplitude dos pulsos do GnRH podem influenciar as quantidades relativas de FSH e LH secretadas pelos gonadotrofos. O FSH e o LH são glicoproteínas com uma subunidade α idêntica (também compartilhada com o TSH) e uma subunidade β específica. O gene para o LH sofreu recentemente aumento por duplicação para produzir o βHCG, uma gonadotrofina secretada por tecidos embrionários.

A GnRH é essencial para a secreção de FSH e LH intactos, mas a retrorregulação do estradiol e da testosterona, juntamente com os peptídios das gônadas como a inibina, têm um papel importante na função reprodutiva. A retroalimentação pelo estradiol é especialmente interessante porque ela pode ter tanto efeitos negativos quanto positivos nas gonadotrofinas, dependendo do estágio do ciclo menstrual. Um perfil do controle dos eixos hipotálamo-pituitária-gônadas, tanto para mulheres quanto homens adultos, é mostrado na Figura 39.9. A meia-vida do LH no plasma é de aproximadamente 50 minutos; o FSH tem meia-vida mais longa, de cerca de 4 horas. Tanto as concentrações de FSH quanto de LH variam consideravelmente dependendo da idade e do sexo.

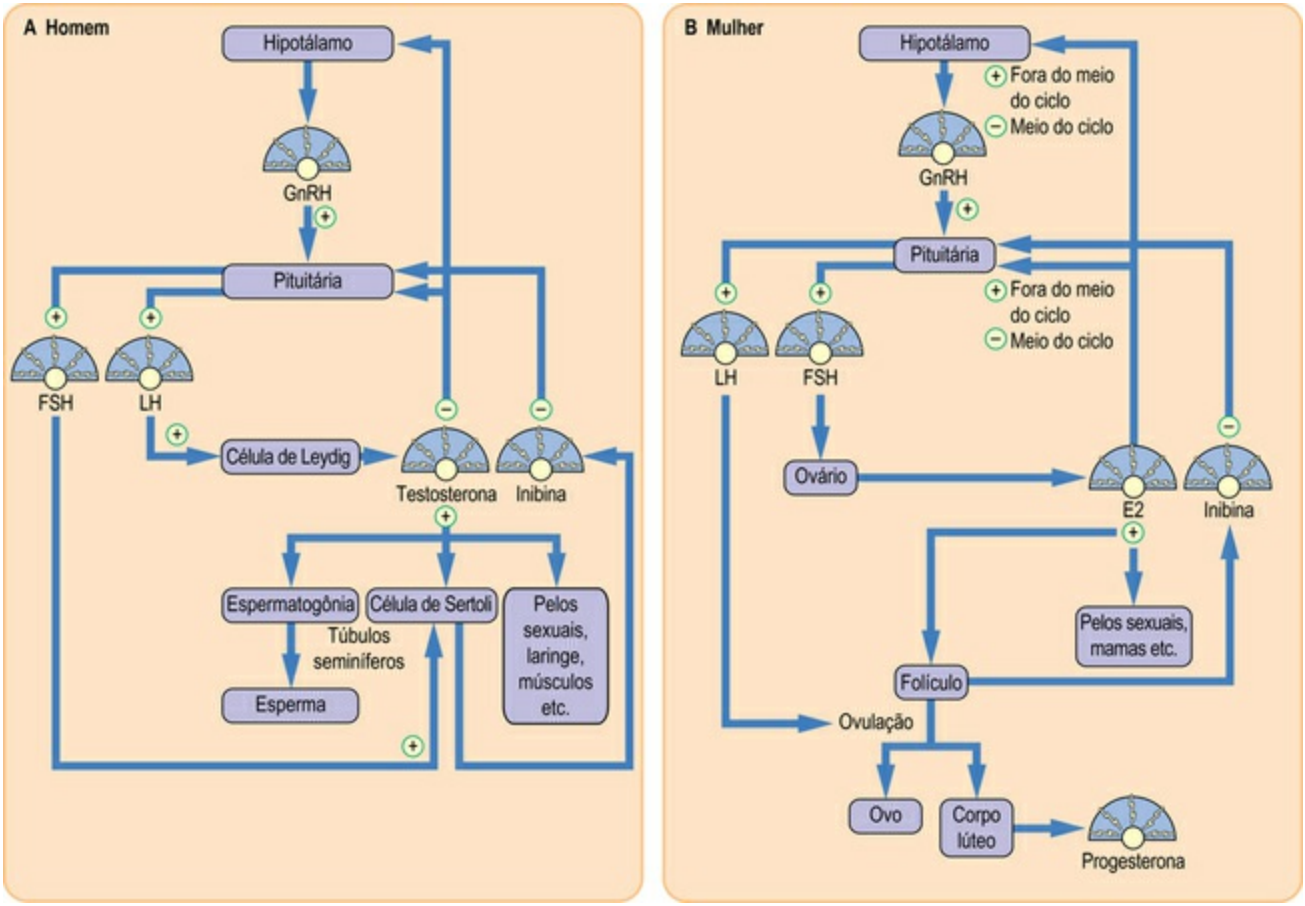


FIG. 39.9 Controle dos eixos hipotálamo-pituitária-gônadas. **(A)** No homem, a testosterona é produzida a partir do colesterol nas células de Leydig sob a estimulação do LH. A testosterona e o FSH dão suporte à espermatogênese. **(B)** Na mulher, o estradiol (E_2) é produzido pelas células granulosas e pelo folículo em desenvolvimento após a estimulação por retroalimentação. A retroalimentação pelo E_2 é principalmente negativa, mas, no meio do ciclo, exerce uma retroalimentação positiva de E_2 resultando no surto de LH que causa a ovulação. A progesterona (P) é secretada pelo corpo lúteo resultante.

Ações do FSH e do LH nos testículos

O FSH e o LH influenciam a espermatogênese

Nos homens, a biossíntese da testosterona ocorre nas células de Leydig dos testículos, sob a influência primária do LH (Fig. 39.10), atuando por meio do receptor de LH acoplado à proteína G. Os altos níveis intratubulares de testosterona cooperam com o FSH na promoção da espermatogênese no túbulo espermático: o FSH se liga a seu receptor específico na célula de Sertoli dos testículos e, por um mecanismo similar ao do LH, induz o aumento da síntese de diversas proteínas, incluindo a **proteína ligante de androgênios** (ABP) e a **inibina**. A ABP é secretada no lúmen dos túbulos seminíferos, onde se liga à testosterona (ou sua forma ativa, a di-hidrotestosterona). Isso garante alta concentração local de androgênio, que, juntamente com o FSH, promove as divisões meióticas que são necessárias para a espermatogênese. A inibina tem um papel na alça de retroalimentação negativa do FSH.

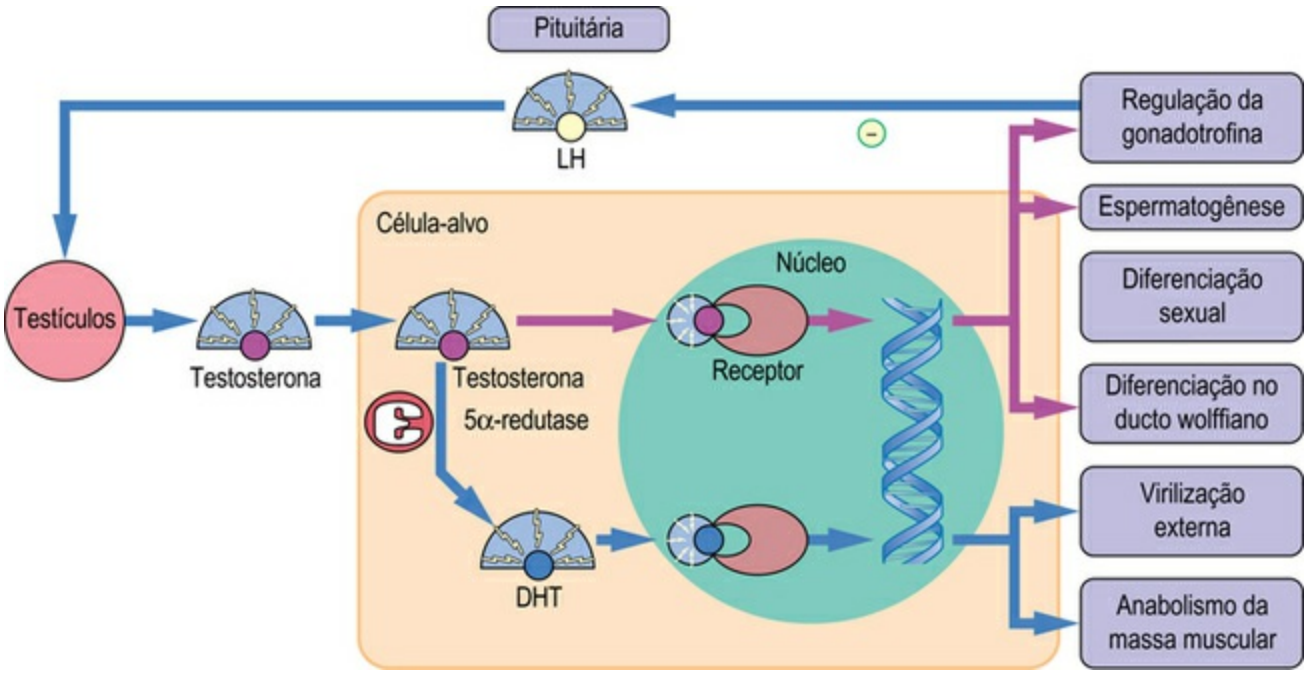


FIG. 39.10 Mecanismos de ação da testosterona. A testosterona derivada dos testículos entra na célula-alvo e se liga ao receptor de androgênio, tanto diretamente quanto após a conversão em 5α-di-hidrotestosterona (DHT). A DHT se liga mais firmemente do que a testosterona, e o complexo DHT-receptor se liga mais eficientemente à cromatina. As ações finais mediadas pela testosterona dentro da célula são mostradas pelas setas púrpuras, aquelas mediadas pela DHT são mostradas pelas setas azuis.

Ações bioquímicas da testosterona nos homens

A testosterona não só influencia a regulação da gonadotrofina e da espermatogênese, mas também é um esteroide anabólico natural

Quase 95% da testosterona sérica são originados dos testículos; o restante se origina da glândula adrenal. Mais de 97% da testosterona circulante estão ligados à proteína, com quantidades iguais ligadas à **albumina** e à **globulina ligadora de hormônio sexual** (SHBG), que tem uma estrutura similar à da ABP. A testosterona é metabolizada nos tecidos-alvo em **di-hidrotestosterona** (DHT) mediante a redução do carbono 5-α, com mais do que o dobro da afinidade pelo receptor de androgênio nuclear. Além dos efeitos na regulação da gonadotrofina e na espermatogênese, os androgênios induzem o desenvolvimento do trato reprodutivo a partir dos ductos wolffianos durante a diferenciação sexual masculina. Eles também têm efeitos anabólicos, estimulando a síntese proteica e um aumento na massa muscular (Fig. 39.10).

Distúrbios clínicos da secreção de testosterona nos homens

A deficiência de testosterona pode se originar de uma ampla faixa de distúrbios do hipotálamo, da pituitária ou dos testículos

A falência endócrina dos testículos pode ocorrer devido a trauma ou inflamação (p. ex.,

devido a infecção por caxumba) ou por falência ao nível do hipotálamo ou da pituitária. De fato, os **gonadotrofos estão entre os tipos celulares da pituitária anterior mais sensíveis ao dano dessa glândula** (p. ex., devido ao crescimento de um adenoma na estrutura óssea da sela túrcica) e, consequentemente, a falência gonadal é frequentemente a primeira manifestação da doença pituitária. O hipogonadismo central pode também ser uma resposta à **perda de peso severa ou ao estresse fisiológico**, situação em que é mais bem visto como um mecanismo de poupança energética de emergência, sendo adicionalmente observado na **síndrome de Cushing** ou no uso crônico de **fármacos opioides**.

Há uma série de distúrbios genéticos que se manifestam como falência gonadal

A **síndrome de Klinefelter**, causada pela aquisição de um cromossomo X adicional nos homens (cariótipo 47, XXY), se apresenta com ginecomastia (aumento anormal do tamanho das mamas masculinas), eunucoidismo e graus variados de hipogonadismo e é decorrente do desenvolvimento anormal dos testículos. O FSH sérico e o LH estão geralmente elevados, mas os níveis de testosterona podem ser subnormais. A **síndrome de Kallmann**, pelo contrário, é um distúrbio genético hipotalâmico em crianças, contemplando tanto produção deficiente de GnRH quanto a comum ausência de olfato (anosmia) devido à migração defeituosa de neurônios produtores de GnRH (e outros) para o hipotálamo durante o desenvolvimento intrauterino. Os indivíduos afetados apresentam puberdade atrasada e níveis plasmáticos de FSH, LH e testosterona subnormais. A deficiência de androgênio pode levar à redistribuição dos músculos e da gordura e à perda de densidade mineral óssea, e estas podem ser corrigidas, até certo grau, pela administração de androgênios (Tabela 39.6).

Tabela 39.6
Causas do hipogonadismo

Local do defeito	Bioquímica	Causas
Hipotálamo	Baixo GnRH* Baixos LH e FSH Baixa razão E_2/testosterona	Tumores Irradiação Distúrbios genéticos, p. ex., Síndrome de Kallmann Mutações na kisspeptina ou em seu receptor Mutações na neuroquinina B ou em seu receptor
Pituitária	Alto GnRH* Baixos LH e FSH Baixo E2/testosterona	Tumores Irradiação Trauma Doenças inflamatórias Distúrbios genéticos Mutações em GnRH Mutações nos fatores de transcrição pituitários
Gônadas	Alto GnRH* Altos LH e FSH Baixa razão E2/testosterona	Irradiação Fisiológica (menopausa) Autoimunidade Infecção (p. ex., orquite da caxumba no homem) Trauma Anormalidades genéticas Síndrome de Klinefelter (47, XXY: homem) Síndrome de Turner (45, X0: mulher)

E2, estradiol.

*Na clínica, o GnRH não é facilmente dosado.

O excesso de androgênio nos homens só é visto na puberdade precoce

A puberdade precoce é uma condição rara que pode resultar de maturação antecipada do eixo hipotálamo-pituitária-gônadas normal, de mutações de ganho de função no receptor do LH ou de um receptor de outra proteína conhecida como kisspeptina (metastina), ou como resultado de um tumor que está secretando tanto androgênios quanto HCG.

Ações do FSH e do LH no ovário

Na mulher, o FSH promove a síntese do estradiol, levando à maturação folicular, enquanto o LH leva à ruptura do folículo e à liberação do óvulo

Na mulher madura, o gerador de pulsos do GnRH se compromete com uma ação recíproca dinâmica com as células ovarianas na manutenção do **ciclo menstrual** hormonalmente direcionado (Figs. 39.9 e 39.11). Os folículos primordiais na verdade começam o crescimento e a maturação, independentemente de hormônios, muitas semanas antes do início do ciclo menstrual. Somente no início do ciclo, quando eles adquiriram a capacidade de responder ao FSH, alguns poucos folículos são preservados da atresia. As concentrações crescentes do FSH estimulam a síntese de estradiol nas

células granulosas mediante a indução da aromatase e de outras enzimas (Fig. 39.7). Com a secreção do estradiol, o FSH diminui e essa combinação desempenha um papel importante na seleção de um folículo dominante para posterior desenvolvimento, embora detalhes do mecanismo preciso ainda precisem ser totalmente estabelecidos. A maturação folicular continua sob a influência das concentrações crescentes do estradiol. O estradiol crescente, devido à retroalimentação positiva no folículo dominante, faz que a retroalimentação central negativa do estrogênio mude para uma retroalimentação positiva, iniciando o surto de secreção de LH. O LH se liga aos receptores no folículo dominante e, em sintonia com os hormônios esteroides e outros fatores como as prostaglandinas, induz o término do primeiro estágio da meiose do óvulo, a ruptura do folículo e a liberação do óvulo cerca de 36 horas depois. Nesse momento há uma queda aguda do estradiol plasmático, seguida de uma queda no LH.

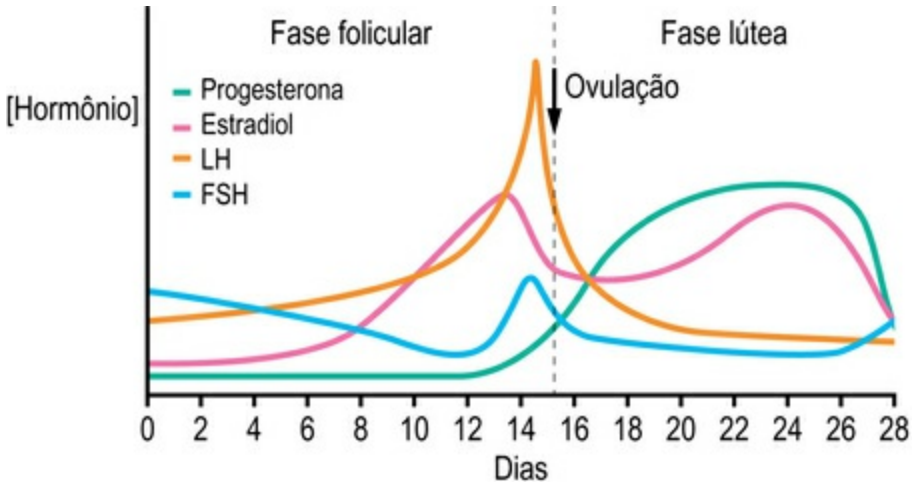


FIG. 39.11 Mudanças na secreção hormonal durante o ciclo menstrual normal. LH, hormônio luteinizante; FSH, hormônio foliculoestimulante.

O folículo rompido se transforma no *corpo lúteo*, que secreta a progesterona e quantidades menores de estradiol, tanto para sustentar o óvulo quanto para preparar o endométrio uterino induzido pelo estrogênio para a implantação de um óvulo fertilizado (ovo) e o estabelecimento da gravidez inicial. Na ausência de fertilização, a função do corpo lúteo declina e a secreção de progesterona e de estradiol diminui. Isso causa alterações vasculares no endométrio, levando a uma involução do tecido e à menstruação. O declínio da secreção de esteroides estimula a secreção de FSH, marcando o estágio para o início do próximo ciclo.

Ações dos hormônios esteroides na mulher

Na mulher com ciclo menstrual normal, é o nível de progesterona que tem significância no diagnóstico

As concentrações de FSH, LH, estradiol e progesterona variam consideravelmente durante o **ciclo menstrual**. Em uma mulher com ciclo normal, a **progesterona** é de utilidade diagnóstica particular: uma concentração sérica superior a 20 nmol/L na fase

lútea (valores precisos variam entre diferentes laboratórios) é consistente com a ovulação (Fig. 39.11). Fora de seus papéis no ciclo menstrual e na reprodução, tanto o estradiol quanto a progesterona têm outros efeitos, atuando por meio de receptores nucleares específicos nas células-alvo. O estradiol, trabalhando em conjunto com outros hormônios, como o IGF-1, é responsável pelo crescimento corporal linear, pelo desenvolvimento das mamas e pela maturação do trato urogenital e a forma do corpo feminino. Na vida adulta, tanto o estradiol quanto a progesterona mantêm a função das mamas, e o estradiol tem um papel importante na preservação da densidade mineral óssea. A progesterona é responsável pelo aumento na temperatura corporal basal durante a fase lútea do ciclo menstrual, e as diminuições na secreção de progesterona podem contribuir para as mudanças de humor pré-menstruais.



Quadro clínico

Terapia de reposição hormonal (TRH)

As mulheres normalmente atingem a menopausa entre os 45 e os 55 anos. A ausência de folículos ovarianos leva à ausência de secreção de estrogênio e de inibina, resultando em aumento marcante do FSH hipofisário. Existem sintomas vasomotores da deficiência de estrogênio (rubor) associados à menopausa. A deficiência de estrogênio pós-menopausa prolongada é conhecida por aumentar a taxa de perda óssea, levando à **osteoporose**, e também por alterar o metabolismo das lipoproteínas de modo a aumentar o **risco de doença cardiovascular.** A TRH com uma preparação de estrogênio foi prática padrão desenvolvida na maioria dos países desenvolvidos, tanto para aliviar os sintomas agudos como para fornecer profilaxia contra os riscos em longo prazo. Contudo, estudos recentes demonstraram que a TRH aumenta o risco de **câncer de mama, doença cardiovascular, derrame e embolia pulmonar**. Embora a TRH tenha um efeito modesto na prevenção da osteoporose, existem novas substâncias, os bifosfonatos, que têm a mesma eficiência. As recomendações correntes são de que **a TRH deve ser usada apenas como terapia em curto prazo** para os sintomas vasomotores que não respondem a outros tratamentos.

Distúrbios na secreção de esteroides na mulher

Assim como no homem, os distúrbios endócrinos da secreção subnormal de esteroides sexuais na mulher podem resultar de uma ampla faixa de distúrbios no hipotálamo, na pituitária ou no ovário

Assim como nos testículos, a falência endócrina dos ovários pode ocorrer devido a dano ou disfunção dos próprios ovários ou pelos defeitos ao nível do hipotálamo ou da pituitária. Diversas patologias, incluindo os adenomas pituitários e a síndrome de Kallmann, são comuns ao homem e à mulher. Contudo, na mulher, o distúrbio genético mais comum que afeta os ovários é a **síndrome de Turner** (cariótipo 45X), que tem

aspectos somáticos característicos que incluem baixa estatura, FSH e estradiol pré-puberal séricos elevados e ovários vestigiais ou "em fita". Várias outras causas endócrinas de infertilidade são mostradas na Tabela 39.6, mas estão muito além dos objetivos deste texto.

As síndromes da secreção excessiva de esteroides ovarianos levam à puberdade precoce em crianças e à infertilidade e/ou ao hirsutismo nos adultos

A **puberdade precoce** pode surgir a partir da maturação antecipada do eixo hipotalâmico-gonadal normal, de um cisto ovariano, tumor ovariano ou da adrenal (secretores de estradiol ou androgênios), da hiperplasia adrenal congênita ou da resistência grave à insulina. Na mulher madura, a hipersecreção de androgênio na **síndrome do ovário policístico** (PCOS) pode resultar em infertilidade e/ou hirsutismo. Embora a etiologia da PCOS permaneça incerta, ela mostra forte predisposição genética, e as teorias atuais sugerem um papel-chave do metabolismo intraovariano aberrante dos androgênios, em alguns casos fortemente influenciado pela resistência sistêmica à insulina. Contudo, a natureza da comunicação entre a ação da insulina e a produção ovariana de androgênios, clinicamente importante, ainda não está clara.

O Eixo do hormônio do crescimento

O hormônio liberador do hormônio do crescimento (GHRH) e a somatostatina

O GHRH é um peptídio de 44 aminoácidos sintetizado como parte de um pró-hormônio de 108 aminoácidos nos núcleos arqueado e ventromedial do hipotálamo e na eminência medial

O **GHRH** se liga a seu receptor nas células somatotrópicas pituitárias e induz os sistemas da adenilato ciclase e cálcio-calmodulina intracelular (Cap. 40) a estimular a transcrição e a secreção do GH a partir da pituitária anterior. A retroalimentação negativa do GH e do IGF-1 resulta em diminuição na síntese e na secreção do GHRH e aumento na síntese e na secreção da somatostatina.

A **somatostatina** é encontrada em duas isoformas, com 14 e 28 aminoácidos, respectivamente, ambas produzidas a partir do mesmo produto gênico de 116 aminoácidos. A somatostatina e seus receptores são encontrados por todo o cérebro e também em outros órgãos, notavelmente o intestino. A ligação da somatostatina ao seu receptor está acoplada à adenilato ciclase por uma proteína inibitória de ligação ao nucleotídio guanina, resultando em diminuição do cAMP intracelular. No contexto do crescimento, a somatostatina inibe a secreção de GH. O GHRH e a somatostatina são liberados em surtos separados para possibilitar um nível muito fino de controle da liberação de GH. A somatostatina também inibe a produção ou a ação de muitos outros hormônios, incluindo o TSH, a insulina, o glucagon e a gastrina. **Os análogos de ação prolongada da somatostatina são, portanto, efetivos no tratamento do excesso de GH**,

assim como de tumores que secretam uma ampla faixa de outros hormônios e como adjuntos da cirurgia pancreática para inibir as secreções exócrinas a partir de resíduos pancreáticos durante a recuperação.

Hormônio do crescimento

A maior secreção de GH ocorre em crianças e adultos jovens, principalmente durante o sono

Embora o GH possa existir em formas distintas, a principal espécie é uma proteína de 22 kDa. Aproximadamente dois terços do GH na circulação estão associados a uma **proteína de ligação** de 29 kDa que é idêntica ao domínio extracelular do receptor de GH. Essa proteína de ligação prolonga a meia-vida do GH no plasma por cerca de 20 minutos.

A pituitária humana normal contém aproximadamente 10 mg de GH; menos de 5% são liberados a cada dia. Essa liberação ocorre em surtos com uma periodicidade de 3-4 horas, e a maior atividade secretória ocorre durante o sono. No pico de um surto secretório, a concentração de GH plasmático pode ser 100 vezes maior do que em níveis basais; isso significa que **nenhum intervalo de referência pode ser escolhido para esse hormônio** e, por isso, medições significativas requerem tanto um **teste provocativo** quanto **múltiplas amostras** durante o curso de um dia. Os surtos secretórios ocorrem mais frequentemente em crianças e jovens adultos.

O GH tem uma ampla faixa de ações na regulação do crescimento e no metabolismo intermediário

Não é surpresa, em vista da ampla faixa de ações do GH, que diversos fatores além do GHRH e da somatostatina possam influenciar a secreção de GH. Eles incluem outros hormônios (estradiol) e metabólitos energéticos (glicose). Diversos agentes farmacológicos também são conhecidos por influenciar a secreção de GH. Esses fatores atuam em centros superiores e no hipotálamo para alterar os padrões de secreção do GHRH e da somatostatina.

A ligação do GH ao seu receptor precipita uma série complexa de eventos intracelulares que levam à transcrição de muitas enzimas, hormônios e fatores de crescimento, incluindo o IGF-1

A diversidade da ação do GH torna difícil entender ou integrar todas as suas funções; logo, é conveniente pensar em duas fases distintas (Fig. 39.12). As ações diretas do GH são nos **metabolismos dos lipídios, carboidratos e proteínas**. Durante a hipoglicemia, o GH estimula a lipólise e induz a resistência periférica à insulina. Esses efeitos estimulam o uso dos ácidos graxos nos tecidos periféricos, poupando a glicose para o uso no cérebro. Antes, a terapia do GH era usada somente para o tratamento da deficiência de GH em crianças de modo a estimular o crescimento; agora, o tratamento é frequentemente estendido para a vida adulta em algumas situações em que possa melhorar a qualidade de vida. Essa mudança na estratégia de tratamento ilustra os

efeitos complexos do GH no metabolismo. Durante o crescimento, o GH estimula a captação de aminoácidos e sua incorporação em proteínas, especialmente no músculo. As **ações indiretas do GH são mediadas pelo IGF-1**. Essas ações promovem a proliferação de condrócitos e a síntese da matriz cartilaginosa nos tecidos esqueléticos. Embora o GH seja mais frequentemente associado ao seu papel na estimulação do crescimento linear, ele claramente tem outros papéis influenciando a quantidade relativa e a distribuição de gordura e de tecido muscular. Seus efeitos anabólicos são a razão para o **uso ilícito atual no esporte.**

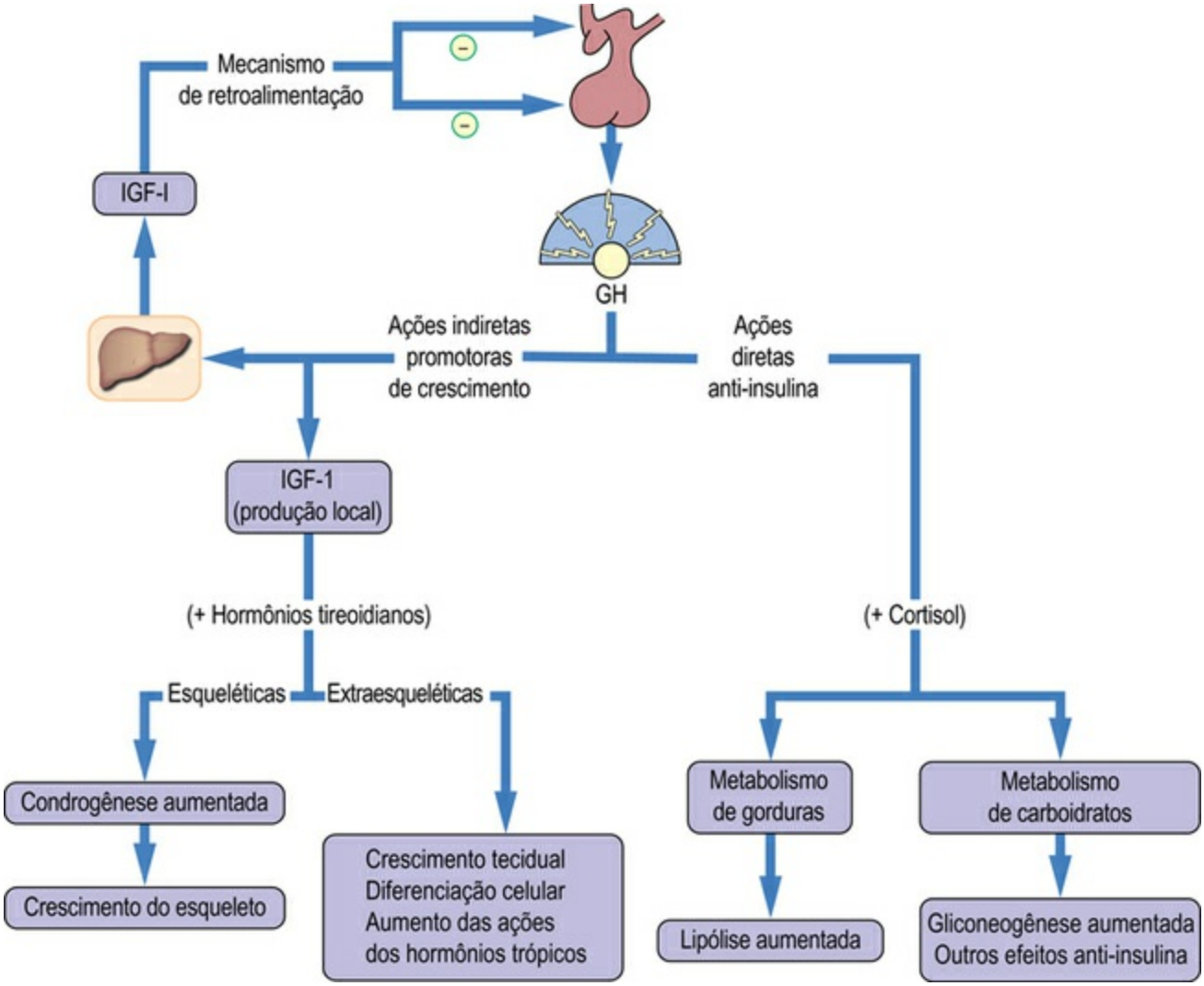


FIG. 39.12 Funções bioquímicas do hormônio do crescimento (GH). Elas podem ser divididas convenientemente em ações diretas no metabolismo de lipídios e de carboidratos e ações indiretas na síntese proteica e na proliferação celular.

Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1)

O IGF-1 é o mais dependente do GH de uma série de fatores de crescimento

O IGF-1 é um peptídio básico de cadeia única com 70 aminoácidos que tem uma homologia considerável com a pró-insulina. Em resposta aos hormônios trópicos como o GH, o IGF-1 é produzido em muitos tecidos cujo crescimento é então estimulado, ou seja,

o IGF-1 atua como um **hormônio parácrino**. O fígado é a principal fonte do IGF-1 circulante, cuja função é primariamente a inibição por retroalimentação da secreção de GH. No plasma e em outros fluidos extracelulares, o IGF-1 está complexado com uma série de **proteínas ligantes de IGF** (IGFBPs), das quais a IGFBP-III é a mais abundante. O IGF-1 trabalha por meio do **receptor de IGF tipo 1** (IGF-IR), o qual é estruturalmente similar ao receptor de insulina e ligado à atividade tirosina cinase intracelular. As afinidades relativas da insulina e do IGF-1 por seus respectivos receptores significam que, na fisiologia normal, há uma pequena estimulação cruzada, embora em situações patológicas e farmacológicas seja possível, para a insulina, exercer alguma ação por intermédio do receptor de IGF-1 e vice-versa. Isso tem implicações para os estados de **resistência grave à insulina**, nos quais a ativação local do IGF-IR foi sugerida como sendo subjacente a algumas características clínicas como crescimento excessivo da pele **(acantose *nigricans*)**. Inversamente, o IGF-1 tem papel terapêutico limitado em algumas condições raras causadas pela perda da função do receptor de insulina.

O intervalo de referência do plasma para o IGF-1 em adultos com idade entre 20 e 60 anos é razoavelmente constante. Ele é muito menor em crianças jovens, mas aumenta drasticamente durante o período de crescimento e progressão ao longo da puberdade. As concentrações de IGF-1 diminuem após a sexta década de vida. Logo, o IGF-1 parece ser um bom marcador da atividade integrada do GH.

Distúrbios clínicos da secreção de GH

A deficiência de GH em crianças é uma das diversas causas da estatura baixa, enquanto o excesso de GH em crianças leva ao gigantismo e, nos adultos, à acromegalia

A ausência de uma faixa de referência plasmática para o GH significa que a deficiência de GH só pode ser diagnosticada pelo estudo da dinâmica da secreção de GH durante o sono ou seguindo um teste de estimulação. As **medições basais do IGF-1 e da IGFBP-III** podem servir como testes preliminares de detecção. O tratamento é por injeção regular de GH humano recombinante. Os adultos com causa clara de deficiência de GH (hipopituitarismo) também são candidatos à terapia de reposição desse hormônio. Uma causa genética rara da baixa estatura é o **nanismo de Laron**, no qual os níveis de GH estão elevados, mas os de IGF-1 são subnormais – um defeito no receptor do GH é o responsável.

Na maioria dos casos, o excesso de GH é causado por um tumor da pituitária

O excesso de GH é mais comumente decorrente de um **tumor pituitário secretor de GH**; no entanto, tumores secretores de GHRH no hipotálamo e a produção ectópica de GHRH a partir de tumores pancreáticos foram descritos. Em crianças, o excesso de GH se manifesta como **gigantismo**. Em adultos, as epífises dos ossos longos se fecharam e, portanto, um crescimento linear adicional não é possível. Por isso a forma adulta, a **acromegalia**, é caracterizada por espessamento dos tecidos e crescimento excessivo dos

ossos de mãos, pés e face (Fig. 39.13). Lábios e língua aumentados com crescimento mandibular inferior excessivo dão origem a uma aparência facial característica. O suor excessivo e a dor nas articulações também são sintomas comuns. Infelizmente, a progressão da acromegalia é tão lenta que uma média de nove anos se passa entre o início dos sintomas e o diagnóstico. Classicamente, o diagnóstico do excesso de GH se baseava na apresentação da supressão inadequada de GH durante um teste-padrão de tolerância a 75 g de glicose oral e nos níveis elevados de IGF-1. Todavia, os pacientes na puberdade podem ter respostas paradoxais à glicose, e os níveis de IGF-1 estão normalmente elevados durante esse estágio do desenvolvimento. Assim, a evidência de um tumor pituitário obtida usando-se a **ressonância magnética** (IRM) é crítica para o estabelecimento do diagnóstico adequado. A **cirurgia** é o tratamento preferido, embora a **somatostatina de ação prolongada** também seja efetiva. Mais recentemente, o Pegvisomant, um antagonista do GH desenvolvido racionalmente com base em características estruturais da interação hormônio-receptor, também se mostrou útil em casos refratários.



FIG. 39.13 Acromegalia. Mãos grandes, algo quadradas ou "em forma de pá" são apresentadas em comparação com uma mão normal, ao centro.

Quadro de teste clínico

Confirmação bioquímica da gravidez

A confirmação bioquímica de gravidez é atualmente efetuada por meio de um teste simples e sensível que fornece resultados confiáveis **com duas semanas de fertilização** (isto é, antes do próximo período menstrual). Os testes de gravidez podem ser feitos por médicos, enfermeiros ou até mesmo pelos próprios interessados, uma vez que são facilmente comprados em farmácias. Os testes de gravidez são imunoensaios que avaliam a produção de **gonadotrofina coriônica humana (HCG)**. Um imunoensaio específico em sanduíche é empregado (Fig. 39.2). Um anticorpo reconhece a subunidade α do HCG enquanto o outro se liga somente a um segmento de 32

aminoácidos da subunidade β, que só existe no HCG (Fig. 39.10). Uma vez que uma mulher não grávida não produz normalmente HCG, a detecção mesmo em níveis baixos dos primeiros estágios do desenvolvimento placentário é suficiente para confirmar a gravidez.

O Eixo da prolactina

Dopamina

A dopamina é um inibidor da secreção de prolactina

A prolactina é o único entre os hormônios pituitários que está predominantemente sob o **controle inibitório** do hipotálamo (Fig. 39.4). Além disso, o agente controlador é uma molécula simples, a **dopamina** (Cap. 41.1), que é produzida pelos neurônios de dopamina tuberoinfundibulares. A dopamina atua estimulando os receptores D2 dos lactotropos pituitários para inibir a adenilato ciclase e, consequentemente, inibir tanto a síntese quanto a secreção da prolactina. Vários neuropeptídios, incluindo o TRH, têm propriedades liberadoras de prolactina, mas há pouca evidência de seus papéis fisiológicos.

Prolactina

A prolactina pode auxiliar o crescimento mamário e a formação de leite em associação a outros hormônios relacionados com a gravidez

A prolactina é uma proteína de 23 kDa homóloga ao GH cujo papel primário em humanos ocorre durante a **gravidez**, quando ela se liga a seu receptor no tecido mamário e estimula a síntese de diversas proteínas do leite, incluindo a lactoalbumina. Em outros animais, a prolactina também tem efeitos gonadotróficos, imunológicos e hematológicos: ela é necessária para a manutenção da gravidez em roedores, é mitogênica para algumas células do sistema imunológico e melhora algumas formas de anemia. A prolactina exerce seus efeitos na função reprodutiva da mulher em múltiplos níveis. Suas ações incluem o bloqueio da ação do FSH na secreção folicular do estrogênio e no aumento dos níveis de progesterona pela inibição de enzimas metabolizadoras de esteroides.



Quadro de teste clínico

Macroprolactina

Embora os imunoensaios baseados em anticorpos sejam ferramentas extremamente poderosas no diagnóstico endócrino, eles estão sujeitos a interferências por anticorpos endógenos de diversas maneiras. **Uma maneira pela qual os anticorpos endógenos podem produzir resultados confusos é pela ligação e agregação do hormônio-alvo em complexos de alto peso molecular (APM)**. Isso pode ser visto em diversos hormônios

peptídicos, mas é particularmente problemático na prolactina, sendo que a conhecida "macroprolactina" pode ser responsável por mais de 10% dos casos de prolactina sérica aparentemente elevada. Trata-se de um problema, já que a macroprolactina geralmente não é biologicamente ativa e por isso sua detecção pode levar a um tratamento desnecessário. Existem diversos modos de contornar isso. Mais simplesmente, como os diferentes imunoensaios frequentemente têm diferentes capacidades de detectar a macroprolactina, o uso de mais de um ensaio pode fornecer uma forte pista de sua presença. Segundo, uma técnica comum é precipitar os complexos APM com polietilenoglicol (PEG), com os imunoensaios sendo feitos antes e após essa precipitação para estabelecer o desconto de quanto sinal é perdido na fração APM. Uma quantificação mais precisa pode requerer técnicas trabalhosas, como a filtração em gel.

Distúrbios clínicos da secreção de prolactina

Não existem síndromes conhecidas de deficiências de prolactina, mas a hiperprolactinemia é muito comum

A hiperprolactinemia pode resultar de um tumor pituitário secretor de prolactina **(prolactinoma)**, de um suprimento deficiente de dopamina do hipotálamo ou do uso de qualquer uma da grande série de fármacos antidopaminérgicas. Na mulher, as características presentes da hiperprolactinemia incluem **irregularidade menstrual e galactorreia** (liberação de leite da mama).

Prolactina sérica altamente elevada é geralmente um diagnóstico de prolactinoma

Para indivíduos com hiperprolactinemia modesta, que não estão tomando fármacos antidopaminérgicos, o diagnóstico é mais difícil; imagens da pituitária e/ou testes dinâmicos da secreção de prolactina irão auxiliar o diagnóstico de um microprolactinoma. As opções de tratamento incluem **fármacos agonistas de dopamina de ação prolongada ou cirurgia**. Os prolactinomas precisam ser observados com cuidado, principalmente durante a gravidez, quando há hiperplasia fisiológica dos lactotropos pituitários em antecipação à lactação.

Nos homens, a hiperprolactinemia pode causar **impotência e hiperplasia prostática**. Contudo, como outras doenças produzem mais comumente esses sintomas, o diagnóstico da hiperprolactinemia é frequentemente ignorado até que os prolactinomas se tornem muito grandes e se apresentem como hipopituitarismo com defeitos no campo visual. Esses sintomas surgem quando o tumor se expande para fora da fossa pituitária e invade o quiasma do nervo óptico. Esses tumores frequentemente encolhem e se tornam fibrosos com a terapia agonista com dopamina. Por essa razão é muito importante identificar quais pacientes com grandes tumores pituitários têm níveis muito altos de prolactina, já que eles podem evitar a necessidade de cirurgia.

Processos endócrinos não considerados neste capítulo

O corpo humano contém vários outros processos endócrinos não considerados neste capítulo, embora sejam governados pelos mesmos princípios gerais. Alguns desses processos são considerados em outros capítulos, como parte da função fisiológica que eles controlam. Assim, o leitor é encaminhado para os Capítulos 21, para a **homeostasia de carboidratos**; 26, para a **homeostasia do cálcio**; e 24, para a **homeostasia de água e eletrólitos** e o **controle da pressão sanguínea.** Os sistemas de sinalização intracelular por meio dos quais os hormônios exercem seus efeitos são descritos no Capítulo 40.

Resumo

- **O sistema endócrino** produz hormônios, um grupo estruturalmente diverso de mensageiros químicos que regulam e coordenam o metabolismo, o crescimento, a reprodução e as respostas a estímulos externos do corpo todo.
- **O eixo hipotálamo-pituitária anterior** é uma ligação crítica entre o cérebro e as glândulas endócrinas periféricas, e processa diversos estímulos internos e externos em somente uns poucos sinais hormonais: ele controla a síntese e a ação do hormônio tireoidiano, dos glicocorticoides, dos esteroides sexuais, do hormônio do crescimento e da prolactina.
- **O eixo hipotálamo-pituitária anterior** controla a produção e a liberação da ocitocina e da AVP/ADH. A ação desses hormônios nas células é controlada pelos receptores localizados nas membranas celulares ou intracelulares.
- **Os mecanismos de retroalimentação** são importantes no controle dos processos endócrinos, e tanto a hiperatividade quanto a hipoatividade desses eixos produzem síndromes clínicas distintas.
- **O diagnóstico laboratorial dos distúrbios endócrinos** recai fortemente sobre a dosagem dos hormônios no sangue; no entanto, deve-se prestar atenção cuidadosa ao horário da coleta e à natureza da amostra requerida antes que a interpretação significativa dos resultados seja possível.

Questões para aprendizagem

1. Trace um fluxo de mão dupla de informação entre o hipotálamo e os folículos ovarianos no início do ciclo menstrual.
2. Como o GH, o cortisol e a insulina interagem para regular o metabolismo lipídico e de carboidratos?
3. Como o iodo da dieta varia muito, os hormônios tireoidianos precisam ser sintetizados e armazenados quando o iodo está disponível, mas os hormônios tireoidianos são hidrofóbicos e não podem ser contidos dentro de vesículas de membrana. Como a glândula tireoide resolve esse problema?

Leituras sugeridas

Anderson, M. S. Autoimmune endocrine disease. *Curr Opin Immunol*. 2002; 14:760–764.

Cooper, D. S. Hyperthyroidism. *Lancet*. 2003; 363:459–468.

Cooper, D. S., Biondi, B. Subclinical thyroid disease. *Lancet*. 2012; 379:1142–1154.

Dattani, M., Preece, M. Growth hormone deficiency and related disorders: insights into causation, diagnosis and treatment. *Lancet*. 2004; 363:1977–1987.

Dayan, C. M. Interpretation of thyroid function tests. *Lancet*. 2001; 357:619–624.

Franklyn, J. A., Boelaer, K. Thyrotoxicosis. *Lancet*. 2012; 379:1155–1166.

Henderson, J. Ernest Starling and 'hormones': an historical commentary. *J Endocrinol*. 2005; 184:5–10.

Løvås, K., Husebye, E. S. Addison's disease. *Lancet*. 2005; 365:2058–2061.

Melmed, S. Acromegaly. *N Engl J Med*. 2006; 355:2558–2573.

Newell Price, J., Bertagna, X., Grossman, A., et al. Cushing's syndrome. *Lancet*. 2006; 367:1605–1617.

Roberts, C. G.P., Ladenson, P. W. Hypothyroidism. *Lancet*. 2004; 362:793–803.

Semple, R. K., Topaloglu, A. K. The recent genetics of hypogonadotrophic hypogonadism – novel insights and new questions. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2010; 72:427–435.

Plant, T. M. Hypothalamic control of the pituitary-gonadal axis in higher primates: key advances over the last two decades. *J Neuroendocrinol*. 2008; 20:719–726.

Schlechte, J. A. Prolactinoma. *N Eng J Med*. 2003; 349:2035–2041.

Schneider, H. J., Aimaretti, G., Kreitschmann-Andermahr, I., et al. Hypopituitarism. *Lancet*. 2007; 369:1461–1470.

Zimmermann, M. B., Jooste, P. L., Pandav, C. S. Iodine-deficiency disorders. *Lancet*. 2008; 372:1152–1168.

Sites

The Endocrine Society. www.endo-society.org

Endotext.otg. The endocrine source. www.endotext.org

Thyroid disease manager. www.thyroidmanager.org

Pituitary Network Association. www.pituitary.org

Cushing's Support and Research Association. www.CSRF.net

National Endocrine and Metabolic Diseases Information Service. www.endocrine.niddk.nih.gov/

CAPÍTULO 40

Receptores de Membrana e Transdução de Sinal

Ian P. Salt, Margaret M. Harnett and Helen S. Goodridge

Objetivos

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Distinguir entre hormônios esteroides e polipeptídicos e descrever seus mecanismos de ação.
- Descrever os receptores acoplados a proteínas G.
- Descrever a ativação das cascatas jusantes de sinalização intracelular pelas proteínas G heterotriméricas.
- Discutir a formação dos segundos mensageiros, como o monofosfato de adenosina cíclico, o trifosfato de inositol (IP_3), o diacilglicerol (DAG) e o Ca^{2+}, e explicar como eles ativam as proteínas cinases-chave.
- Explicar como as fosfolipases geram uma panóplia diversa de segundos mensageiros lipídicos.
- Discutir como a produção de uma variedade de segundos mensageiros pode amplificar sinais e conduzir à geração de respostas biológicas específicas.

Introdução

Os sinais celulares são processados por *cassettes* que incluem receptores específicos, elementos efetores e proteínas reguladoras

As células percebem, respondem e integram uma multiplicidade de sinais de seu ambiente. Esses sinais podem ser hormônios produzidos em um local que não é o seu sítio de ação **(sinalização endócrina)**; sinais gerados localmente em relação à célula-alvo **(sinalização parácrina)**; sinais de células em contato físico com a célula-alvo **(sinalização**

justácrina); ou sinais gerados pela própria célula-alvo **(sinalização autócrina)**. Os sinais hidrofóbicos e as pequenas moléculas podem atravessar a membrana plasmática e exercer seus efeitos por meio de receptores no interior da célula, ao passo que a maioria dos sinais é hidrofílica, incapaz de atravessar a membrana plasmática lipídica, e requer receptores membranares de superfície celular específicos. Em qualquer dos casos, os sinais são percebidos e processados por ***cassettes* de transdução de sinal celulares** que contêm receptores específicos, elementos efetores de sinalização e proteínas reguladoras. Essas *cassettes* de sinalização servem para detectar, amplificar e integrar diversos sinais externos para gerar a resposta celular apropriada (Fig. 40.1). Em última instância, os sinais podem alterar rapidamente processos celulares como a exocitose e o metabolismo, ou alterar a atividade de fatores de transcrição, levando a alterações na expressão de genes-alvo.

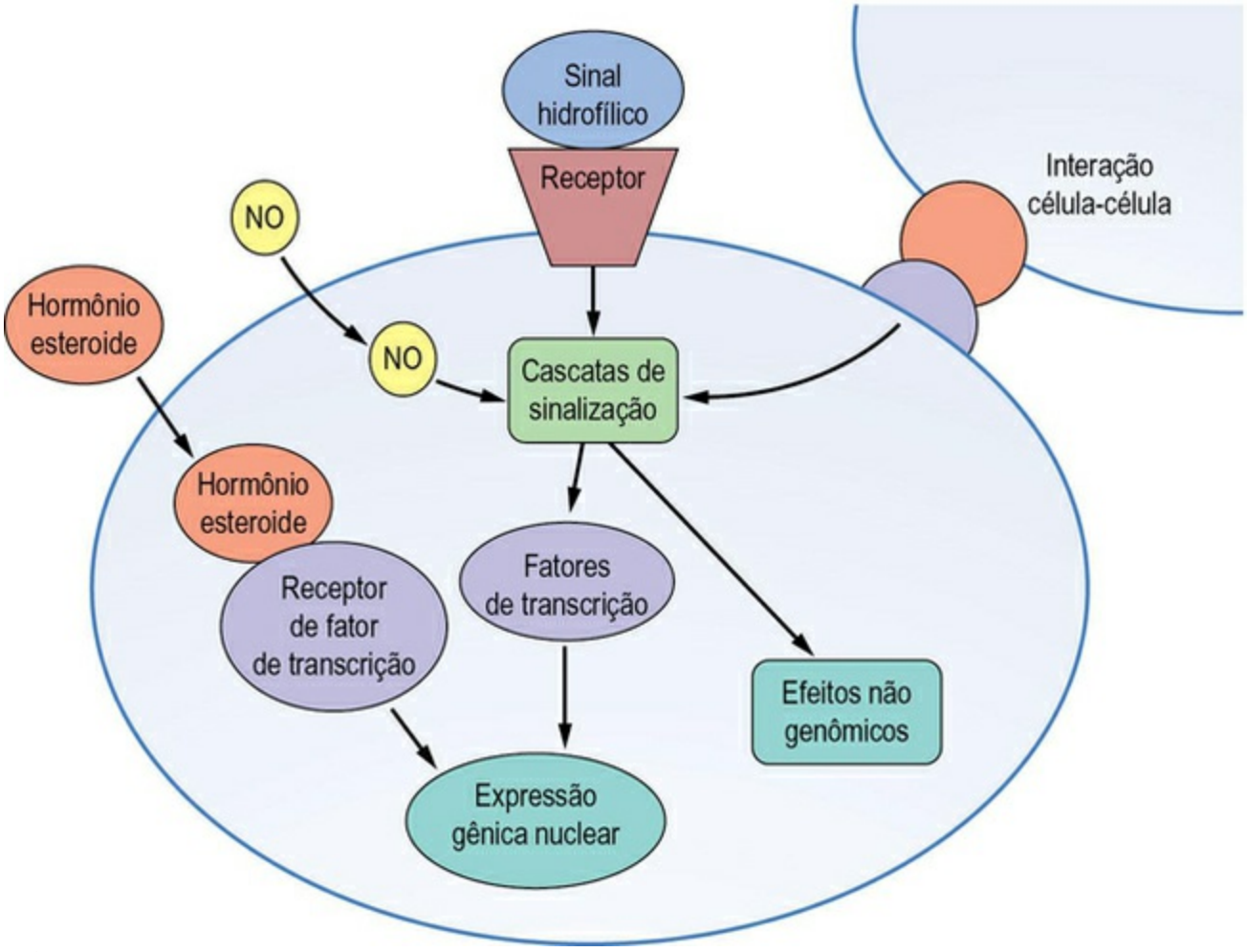


FIG. 40.1 Mecanismos de sinalização celular.
NO, óxido nítrico.

Neste capítulo, discutimos primeiramente como os receptores de superfície celular percebem e transduzem o seu sinal específico por acoplamento transmembranar a sistemas enzimáticos efetores, gerando moléculas de baixa massa molecular denominadas segundos mensageiros. Discutimos em seguida a diversidade desses segundos mensageiros e como eles influenciam a atividade de um conjunto de proteínas cinases-chave com diferentes substratos que, em última instância, determinam

o tipo de resposta biológica obtida.

Tipos de receptores de hormônios e de monoaminas

Os receptores hormonais para hormônios esteroides são diferentes daqueles para hormônios polipeptídicos e monoaminas

Os hormônios são mensageiros bioquímicos que atuam orquestrando as respostas de diferentes células no contexto de um organismo multicelular (Cap. 39). Eles são geralmente sintetizados por tecidos específicos e secretados diretamente no sangue, que os transporta para os órgãos-alvo que a eles respondem. A sinalização hormonal pode ser subdividida, de modo geral, em duas classes principais:

- sinalização hormonal esteroide;
- sinalização hormonal polipeptídica e monoamina.

Os hormônios exercem seus efeitos biológicos por interação com receptores específicos, induzindo cascatas de sinalização intracelular (Tabela 40.1).

Tabela 40.1

Classificação dos receptores de membrana

Classe de receptores	Domínios transmembranares	Atividade catalítica intrínseca	Moléculas acopladoras/reguladoras acessórias	Exemplos de classes de receptores/ligantes
Receptores acoplados a proteínas G (receptores serpentina)	Múltiplas passagens (sete α-hélices transmembranares)	Nenhuma	Proteínas G	Glucagon α-adrenérgico, β-adrenérgico (epinefrina) Muscarínico (acetilcolina) Rodopsina (visão) Quimiocinas (IL-8)
Receptores de canais iônicos (canais regulados por ligantes)	Múltiplas passagens; geralmente foram complexos multiméricos	Atividade de canal iônico	Nenhuma	Neurotransmissores Íons Nucleotídios Trifosfato de inositol (IP_3)
Receptores intrínsecos de tirosina cinase	Domínio transmembranar de passagem única, mas pode ser multimérico (p. ex., receptor de insulina)	Tirosina cinase	Nenhuma	Insulina Fatores de crescimento peptídicos (p. ex., PDGF, FGF, NGF, EGF)
Receptores associados a tirosina cinases	Domínio transmembranar de passagem única, mas geralmente formam receptores multiméricos	Nenhuma	Algumas requerem proteínas contendo ITAM/ITIM	Receptores antigênicos (cinases relacionadas com ITAM-Src) FcγR (cinases relacionadas com

				ITIM-Src) Leptina, IL-6 (cinases Janus)
Receptores intrínsecos de tirosina fosfatase	Domínio transmembranar de passagem única	Tirosina fosfatase	Nenhuma	Receptor CD45 fosfatase
Receptores intrínsecos de serina/treonina cinase	Domínio transmembranar de passagem única	Serina/treonina cinase	Nenhuma	Fator de crescimento tumoral β (TGF-β)
Receptores intrínsecos de guanilato ciclase	Domínio transmembranar de passagem única	Guanilato ciclase (gera GMPc)	Nenhuma	Proteína natriurética atrial (PNA)
Receptores de domínio de morte	Domínio transmembranar de passagem única	Nenhuma	Proteínas acessórias do domínio de morte (TRADD, FADD, RIP, TRAFs)	Fator de necrose tumoral α (TNF-α) Fas

GMPc, monofosfato de guanosina cíclico; FADD, domínio de morte associado ao Fas; FcγR, receptor de Fc-γ (receptor para imunoglobulina G); IL, interleucina; ITAM/ITIM, motivo de ativação/inibição do imunorreceptor tipo tirosina; RIP, proteína de interação com o receptor; Src, tirosina cinase tipo Src; TRADD, domínio de morte associado ao receptor TNF; TRAFs, fatores associados ao receptor TNF; PDGF, fator de crescimento derivado de plaquetas; FGF, fator de crescimento dos fibroblastos; EGF, fator de crescimento epidérmico; NGF, fator de crescimento do nervo.

Os hormônios esteroides atravessam as membranas celulares

Devido à natureza baseada em colesterol de sua estrutura, os hormônios esteroides, como os glicocorticoides, os mineralocorticoides, os hormônios sexuais e a vitamina D, podem atravessar a membrana plasmática das células para iniciar suas respostas por meio de receptores localizados no citoplasma, chamados receptores de hormônios esteroides (Fig. 40.1). Esses receptores pertencem a uma superfamília de receptores citoplasmáticos chamada superfamília de receptores intracelulares, que também transduz sinais de outras pequenas moléculas de sinalização hidrofóbicas, como os hormônios tireoidianos derivados da tirosina (p. ex., tiroxina) e os retinoides derivados da vitamina A (p. ex., ácido retinoico).

Os receptores intracelulares para esteroides e os hormônios tireoidianos e retinoides são fatores de transcrição

Os receptores intracelulares para esses hormônios esteroides, tireoidianos e retinoides são **fatores de transcrição**; eles se ligam a regiões reguladoras do DNA de genes que são responsivos ao hormônio esteroide/tireoidiano particular. Tal "ligação do ligante" (ligação) induz uma alteração conformacional no fator de transcrição que permite que ele ative ou reprima a indução gênica. Embora todas as células-alvo possuam receptores específicos para os hormônios individuais, elas expressam combinações distintas de proteínas reguladoras específicas do tipo celular, que cooperam com o receptor intracelular do hormônio para ditar o repertório preciso dos genes que são induzidos.

Deste modo, os hormônios induzem perfis de resposta distintos em diferentes células-alvo (Cap. 35).

Os hormônios polipeptídicos atuam por meio de receptores de membrana

Ao contrário dos hormônios esteroides, os hormônios polipeptídicos não conseguem atravessar as membranas celulares e devem iniciar seus efeitos em suas células-alvo por meio de **receptores de superfície** celular específicos (Fig. 40.1). Como eles próprios não entram na célula-alvo, são por vezes chamados **"primeiros mensageiros"**. A ligação ao receptor de superfície celular específico causa uma alteração conformacional nesse receptor que pode desencadear **cascatas de sinalização** de várias formas diferentes. A ligação ao receptor pode:

- Regular a produção de moléculas de sinalização de baixo peso molecular, como o monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) ou o cálcio, que são chamados de **"segundos mensageiros"**.
- Alterar a atividade catalítica intrínseca do receptor.
- Alterar o recrutamento de moléculas reguladoras para o receptor (Tabela 40.1).

Outras moléculas que sinalizam por meio de receptores de membrana

Além dos hormônios polipeptídicos, uma vasta gama de moléculas de sinalização usa *cassettes* de transdução de sinal transmembranares para obter seus efeitos biológicos. Tais sinais incluem fatores de crescimento polipeptídicos, sinais polipeptídicos que medeiam a inflamação e a imunidade (citocinas e quimiocinas) e pequenas moléculas hidrofílicas (como acetilcolina, purinas, nucleotídios ou trifosfato de inositol) (Tabela 40.1).

Algumas moléculas de sinalização de baixa massa molecular atravessam a membrana celular

Embora a maior parte dos sinais extracelulares medeie seus efeitos por meio da interação receptor-ligante dos receptores de superfície celular ou dos citoplasmáticos, algumas moléculas de sinalização de baixa massa molecular são capazes de atravessar a membrana plasmática e modular diretamente a atividade dos domínios catalíticos dos receptores transmembranares ou enzimas de transdução de sinal citoplasmáticas (Fig. 40.1). Por exemplo, o óxido nítrico (NO), que tem uma diversidade de funções, incluindo o relaxamento das células do músculo liso dos vasos sanguíneos, pode estimular a guanilato ciclase, levando à produção do segundo mensageiro, o monofosfato de guanosina cíclico (GMPc). Os pacientes com **angina *pectoris*** são tratados com nitroglicerina (NTG), que é convertida em NO, resultando no relaxamento dos vasos sanguíneos que fornecem oxigênio e nutrientes ao coração. A consequente melhora no fornecimento de oxigênio ao músculo cardíaco alivia a dor que foi causada pelo fluxo sanguíneo inadequado para o coração.

Acoplamento de receptores à transdução de sinal intracelular

Os receptores membranares se acoplam a vias de sinalização utilizando mecanismos diversos

Alguns receptores de membrana, como, por exemplo os receptores β-adrenérgicos ou os receptores de antígenos em linfócitos, não possuem atividade catalítica intrínseca e servem simplesmente como unidades de reconhecimento específicas. Esses receptores usam uma diversidade de mecanismos, incluindo moléculas adaptadoras ou moléculas reguladoras cataliticamente ativas, como as proteínas G (guanosina trifosfatases, GTPases, que hidrolisam o GTP) para se acoplarem aos seus elementos de sinalização efetores, os quais são geralmente enzimas (muitas vezes chamadas de enzimas de sinalização ou transdutoras de sinal) ou canais iônicos (Fig. 40.2). Pelo contrário, outros receptores – como os receptores intrínsecos de tirosina cinase para a insulina e muitos fatores de crescimento, ou os receptores intrínsecos de serina cinase para moléculas como o fator β da transformação do crescimento (TGF-β) – possuem domínios extracelulares para a ligação de ligantes e domínios catalíticos citoplasmáticos. Após a ligação ao receptor, esses receptores podem iniciar diretamente suas cascatas de sinalização por fosforilação e modulação das atividades de moléculas-alvo da transdução de sinal (enzimas de sinalização a jusante). Estas, por sua vez, propagam o sinal do fator de crescimento pela modulação da atividade de transdutores de sinal específicos adicionais ou de fatores de transcrição, levando à indução gênica (Cap. 35). Além disso, mecanismos sensoriais como visão (Cap. 41.2), paladar e olfato usam mecanismos similares de transdução de sinal acoplada a receptores membranares de superfície celular (Tabela 40.1).

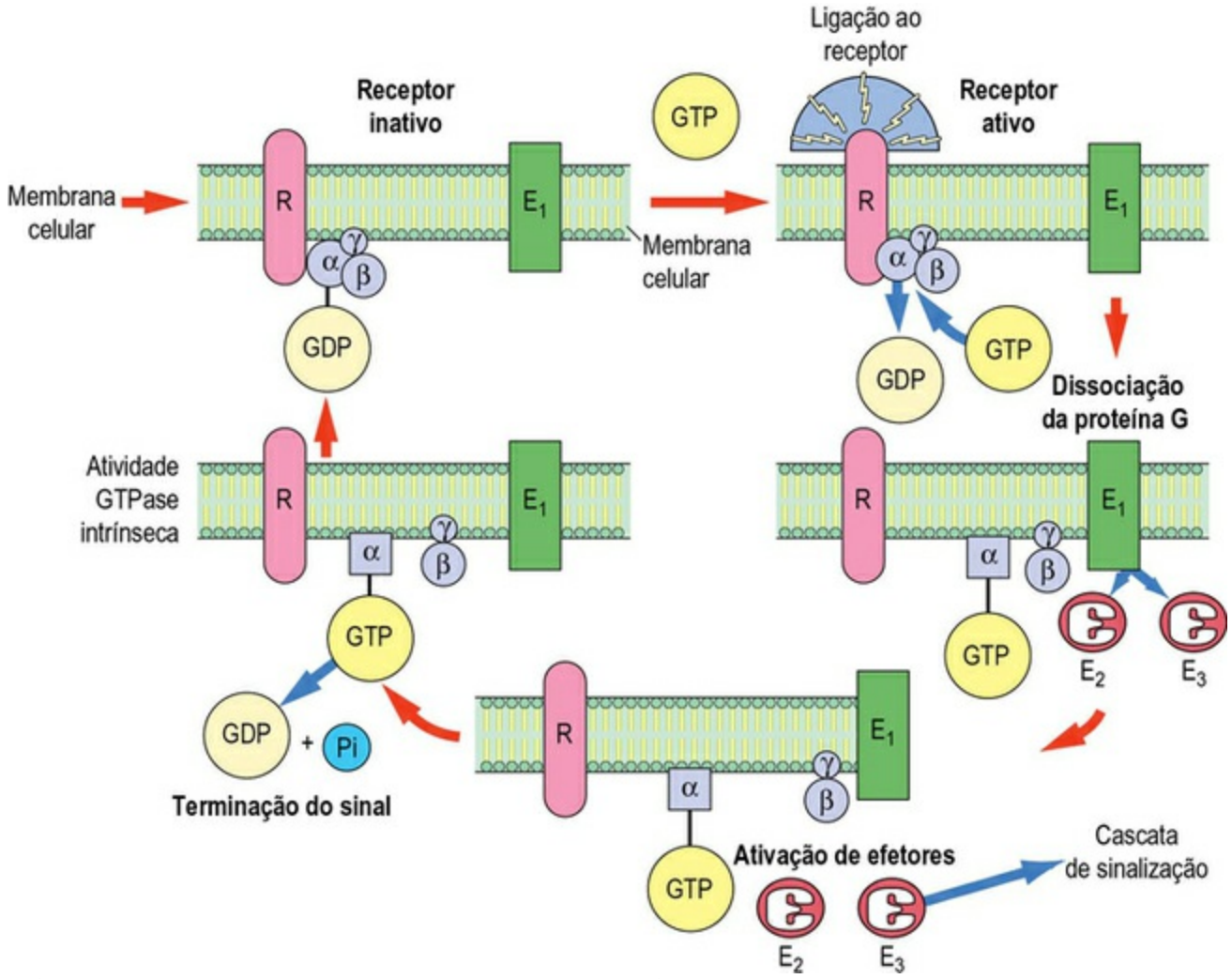


FIG. 40.2 Mecanismo de sinalização das proteínas G.
No estado inativo, as proteínas G existem na forma heterotrimérica com GDP ligado fortemente à subunidade α. Nenhuma das subunidades é uma proteína integral de membrana, contudo a proteína G está ancorada à membrana plasmática por modificação lipídica das subunidades γ (prenilação) e de algumas das subunidades α (miristoilação na família $G_{i\alpha}$). A ligação do receptor (R) leva à troca de GDP por GTP e induz uma alteração conformacional em Gα, que resulta em um decréscimo de sua afinidade, tanto para o receptor quanto para as subunidades βγ, levando à dissociação do complexo receptor-proteína G. A subunidade Gα ativada (ligada ao GTP) ou as subunidades βγ liberadas, ou ambas, podem então interagir com um ou mais efetores para produzir segundos mensageiros intracelulares que ativam as cascatas de sinalização a jusante. A sinalização é terminada pela atividade GTPase intrínseca da subunidade α, que hidrolisa o GTP em GDP, permitindo a reassociação da proteína G heterotrimérica inativa, Gαβγ.

Alguns receptores possuem atividade intrínseca de proteína cinase

A ligação de ligantes a muitos receptores de fatores de crescimento estimula a atividade de proteína cinase de um domínio intracelular do complexo do receptor. O receptor ativado fosforila subsequentemente proteínas substrato, nas quais o fosfato γ do trifosfato de adenosina (ATP) é transferido para os grupos hidroxila das cadeias laterais nos resíduos de serina, treonina ou tirosina. Todas as proteínas cinases dos receptores são serina/treonina cinases ou tirosina cinases específicas, mas nunca ambas. Adicionalmente, as proteínas cinases fosforilam substratos em resíduos específicos de serina, treonina ou tirosina, dependendo da sequência vizinha do sítio de fosforilação. Mediante a ligação ao receptor, as proteínas cinases do receptor se autofosforilam

(fosforilam-se a si mesmas). A introdução do grupo fosfato volumoso e carregado durante a autofosforilação ou em outras proteínas substrato altera acentuadamente a conformação da proteína, causando alterações na atividade ou atuando como sítios de ancoragem para outras proteínas (adaptadoras). As proteínas adaptadoras contêm domínios específicos que reconhecem e se ligam a proteínas fosforiladas. Como as proteínas cinases dos receptores frequentemente fosforilam em vários sítios, isso pode levar a que várias proteínas adaptadoras diferentes sejam recrutadas para o complexo do receptor ativado. Posteriormente, essas proteínas adaptadoras podem se envolver em várias vias de sinalização diferentes.

O exemplo da sinalização da insulina

Um exemplo disso é a sinalização da insulina. A ligação da insulina ao receptor de insulina (IR) causa a ativação e a autofosforilação dos domínios tirosina cinases intracelulares. Proteínas adaptadoras, incluindo proteínas substrato do receptor de insulina (IRS) e proteínas Shc (com homologia Src e semelhantes ao colágeno), se ligam aos resíduos de fosfotirosina no IR. A seguir, os IRs são, eles próprios, fosforilados em resíduos de tirosina pelo IR, gerando locais de ancoragem para a cinase lipídica fosfatidilinositol 3′-cinase (PI3K), que produz fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP_3) na membrana plasmática. O PIP_3 recém-formado recruta a Akt, proteína cinase de serina/treonina, para a membrana plasmática, e a Akt é subsequentemente fosforilada e ativada por outras proteínas cinases (Fig. 40.3). A ativação da Akt é a via de sinalização-chave pela qual a insulina exerce a maioria de seus efeitos metabólicos, incluindo estimulação do transporte de glicose e supressão da gliconeogênese (Cap. 21). A ligação da Shc ao IR ativado conduz ao recrutamento da proteína ligada ao receptor do fator de crescimento (Grb2) para a Shc, que em seguida ativa um fator de troca nucleotídica de guanina (SOS), o qual estimula a pequena proteína G Ras, que inicia uma cascata de proteínas cinases na qual várias proteínas cinases se fosforilam por vez. A sinalização por meio desta via está associada às ações mitogênicas e promotoras de crescimento da insulina. Assim, a ligação de ligantes pode iniciar múltiplas vias de sinalização com diferentes efeitos celulares.

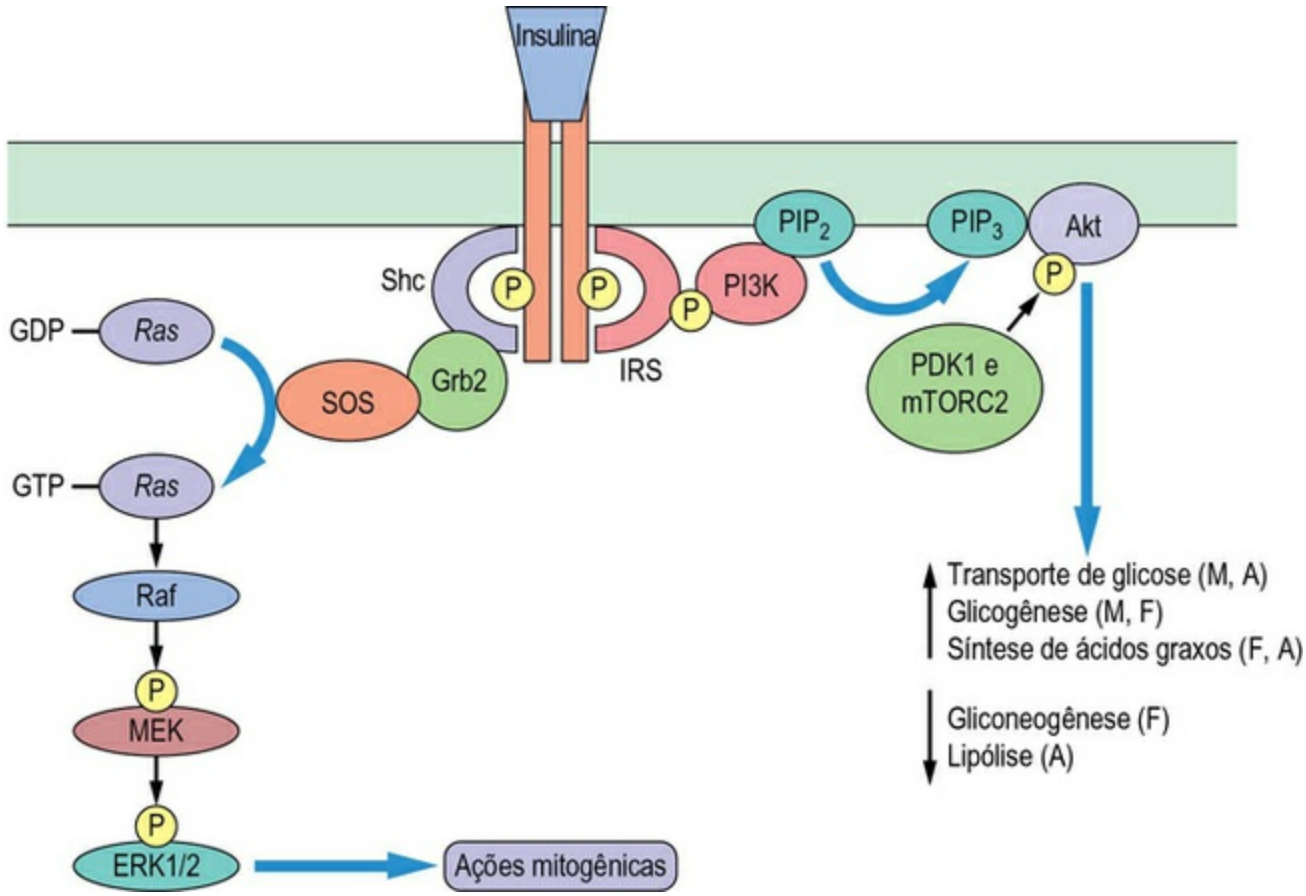


FIG. 40.3 Vias de sinalização da insulina.
A ligação da insulina ao receptor de insulina dimérico com atividade de tirosina cinase estimula a autofosforilação. O substrato do receptor de insulina (IRS) e as proteínas adaptadoras com homologia Src e semelhantes ao colágeno (Shc) se ligam às fosfotirosinas no receptor da insulina. Os IRSs são subsequentemente fosforilados pelo receptor da insulina, gerando locais de ancoragem para a fosfatidilinositol 3'-cinase (PI3K), que produz a molécula sinalizadora lipídica fosforilada fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP_3) a partir de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2). O PIP_3 recruta a proteína cinase de serina/treonina Akt para a membrana plasmática, onde a Akt é fosforilada e ativada pela cinase dependente de fosfoinositídio 1 (PDK1) e pelo complexo do alvo mamífero da rapamicina 2 (mTORC2). A Akt é essencial para os efeitos metabólicos da insulina no músculo (M), fígado (F) e tecido adiposo (A). A Shc ligada ao receptor da insulina recruta a proteína ligada ao receptor do fator de crescimento 2 (Grb2), que se encontra ligado ao fator de troca de nucleotídios de guanina *Son of Sevenless* (SOS). O SOS catalisa a troca GDP-GTP na pequena proteína G *Ras*. A *Ras* ativa ligada ao GTP inicia uma cascata de proteínas cinases na qual a proteína cinase Raf fosforila e ativa outra proteína cinase, a MEK, que subsequentemente fosforila e ativa as proteínas cinases ERK1 e ERK2, que medeiam muitas das ações mitogênicas da insulina.

Alguns receptores membranares são acoplados a proteínas G

Os receptores acoplados a proteínas G fazem parte de uma superfamília de receptores estruturalmente relacionados para hormônios, neurotransmissores, mediadores inflamatórios, proteinases, moléculas do paladar e do olfato e fótons de luz. Um exemplo clássico dessa classe de receptores é o **receptor β-adrenérgico** (para o qual o ligante é a epinefrina), já que as propriedades de sua estrutura-função foram extensamente estudadas no que diz respeito à sua ativação de cascatas de transdução de sinal. Os receptores acoplados a proteínas G são proteínas integrais da membrana caracterizadas pelas sete hélices transmembranares em sua estrutura. Em geral, eles são constituídos por um *N*-terminal extracelular, sete α-hélices transmembranares (com 20-28

aminoácidos hidrofóbicos cada uma), três alças extra e intracelulares e uma cauda *C*-terminal intracelular. Os ligantes, como a epinefrina, se ligam tipicamente ao receptor acoplado a proteínas G, alojando-se em uma bolsa formada pelas hélices transmembranares (Fig. 13.5). Os receptores acoplados a proteínas G não possuem domínios catalíticos intrínsecos; após ativação, eles recrutam proteínas G por intermédio de sua terceira alça citoplasmática para se acoplarem aos seus elementos de transdução de sinal. Os receptores acoplados a proteínas G são frequentemente alvo de fármacos; de fato, estimou-se que aproximadamente 30% de todas as terapêuticas atualmente disponíveis atuem em receptores acoplados a proteínas G. Além disso, usando a informação obtida pelo sequenciamento do genoma humano, torna-se evidente que existem muitos membros adicionais da família dos receptores acoplados a proteínas G cujo sinal não foi ainda identificado.

As proteínas G regulam um conjunto diverso de processos biológicos

As proteínas G constituem um grupo de moléculas reguladoras que estão envolvidas na regulação de uma diversa gama de processos biológicos, incluindo a transdução de sinal, a síntese proteica, o tráfego intracelular (liberação direcionada para a membrana plasmática ou para as organelas intracelulares) e exocitose, assim como movimentação, crescimento, proliferação e diferenciação celular. A superfamília das proteínas G compreende predominantemente duas principais subfamílias: as pequenas proteínas G monoméricas do tipo *Ras* (Cap. 42) e as proteínas G heterotriméricas. As proteínas G heterotriméricas regulam a transdução dos sinais transmembranares a partir de receptores de superfície celular para uma diversidade de efetores intracelulares, como a adenilato ciclase, a fosfolipase C (PLC), a fosfodiesterase dependente de GMPc (PDE) e sistemas efetores de canais iônicos (Fig. 40.2). As proteínas G heterotriméricas consistem em três subunidades: α (39-46 kDa), β (37 kDa) e γ (8 kDa). Em geral, a especificidade do efetor é conferida pela subunidade α, que contém o sítio de ligação do GTP e uma atividade GTPase intrínseca. Contudo, atualmente é amplamente aceito que os complexos $\beta\gamma$ podem também regular diretamente efetores, como a fosfolipase A_2 (PLA_2), as isoformas PLC-β, a adenilato ciclase e canais iônicos em sistemas dos mamíferos, assim como respostas celulares, como as vias do receptor de pareamento na levedura. Foram identificadas quatro subfamílias principais de genes de subunidades α com base na homologia e função do seu cDNA: $G_s\alpha$, $G_i\alpha$, $G_{q/11}\alpha$ e $G_{12/13}\alpha$ (Tabela 40.2). Demonstrou-se que muitas dessas subunidades Gα exibem um padrão relativamente ubíquo de expressão nos sistemas dos mamíferos, pelo menos ao nível do mRNA, mas também está claro que determinadas subunidades α possuem um perfil de expressão restrito ao tecido. Além disso, existe evidência de uma expressão diferencial das subunidades α durante o desenvolvimento celular.

Tabela 40.2

Propriedades das subunidades α das proteínas G mamíferas

Subfamília de proteínas G	Subunidade α	Distribuição tecidual	Toxina substrato	Exemplos de efetores
$G_s\alpha$	$G_s\alpha$	Ubíqua	Toxina colérica	Ativa a adenilato ciclase (G_s, $G_{olf}\alpha$) Canais de K^+ ($G_s\alpha$) Tirosina cinases Src ($G_s\alpha$)
	$G_{olf}\alpha$	Neurônios olfativos, sistema nervoso central	Toxina colérica	
$G_i\alpha$	$G_i\alpha$	Ubíqua	Toxina *pertussis*	Inibe a adenilato ciclase (G_iG_0, $G_2\alpha$) Ativa canais de K^+ (G_i, G_0, $G_2\alpha$) Fosfodiesterase do GMPc ($G_i\alpha$)
	$G_0\alpha$	Tecidos neuronais/neuroendócrinos	Toxina *pertussis*	
	$G_2\alpha$	Neurônios, plaquetas	Nenhuma	
	$G_t\alpha$	Retina	Toxina *pertussis*	
	$G_{gust}\alpha$	Papilas gustativas	Toxina *pertussis*	
$G_{q/11}\alpha$	$G_q\alpha$	Ubíqua	Nenhuma	Ativa a PLC indiretamente por meio da ativação de canais de cálcio Ativa canais de K^+ ($G_q\alpha$)
	$G_{11}\alpha$	Ubíqua	Nenhuma	
	$G_{14}\alpha$	Pulmão, rins, fígado, baço, testículos	Nenhuma	
	$G_{16}\alpha$ ($G_{15}\alpha$ no rato)	Células hematopoiéticas	Nenhuma	
$G_{12/13}\alpha$	$G_{12}\alpha$	Ubíqua	Nenhuma	Ativa a PLCε indiretamente por meio da ativação de canais de cálcio Ativa a PLD Ativa a Rho GEF
	$G_{13}\alpha$	Ubíqua	Nenhuma	

GMPc, monofosfato de guanosina cíclico; PLC, fosfolipase C; PLD, fosfolipase D; Rho GEF, fator de troca do nucleotídio guanina Rho GTPase.

As proteínas G atuam como interruptores moleculares

As proteínas G heterotriméricas regulam sinais transmembranares por atuarem como interruptores moleculares, conectando receptores acoplados à proteína G na superfície celular com uma ou mais moléculas de sinalização a jusante (Fig. 40.2). A ligação do receptor inicia uma interação com a proteína G heterotrimérica inativa ligada ao GDP. Essa interação leva à troca de GDP por GTP, induzindo uma alteração conformacional em Gα que resulta em um decréscimo de sua afinidade tanto pelo receptor quanto pelas subunidades βγ, levando à dissociação do complexo receptor-proteína G. A Gα ativada (ligada ao GTP) ou as subunidades βγ liberadas, ou ambas, podem então interagir com um ou mais efetores para gerar segundos mensageiros intracelulares, que ativam cascatas de sinalização a jusante. A sinalização é terminada pela atividade GTPase intrínseca da subunidade α, que hidrolisa o GTP em GDP para permitir a reassociação da

proteína G heterotrimérica inativa ($G\alpha\beta\gamma$).

Segundos mensageiros

O monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) é uma molécula-chave na transdução de sinal

O cAMP é uma molécula pequena que tem um papel-chave na regulação da transdução de sinal intracelular. O cAMP é derivado do ATP pela ação catalítica da enzima de sinalização **adenilato ciclase** (Fig. 40.4). Essa reação de ciclização envolve o ataque intramolecular do grupo 3′-OH da unidade de ribose do grupo α-fosforil do ATP para formar uma ligação fosfodiéster; isso é conduzido pela hidrólise subsequente do pirofosfato liberado. A atividade do cAMP é terminada pela sua hidrólise em 5′-AMP por fosfodiesterases específicas de cAMP.

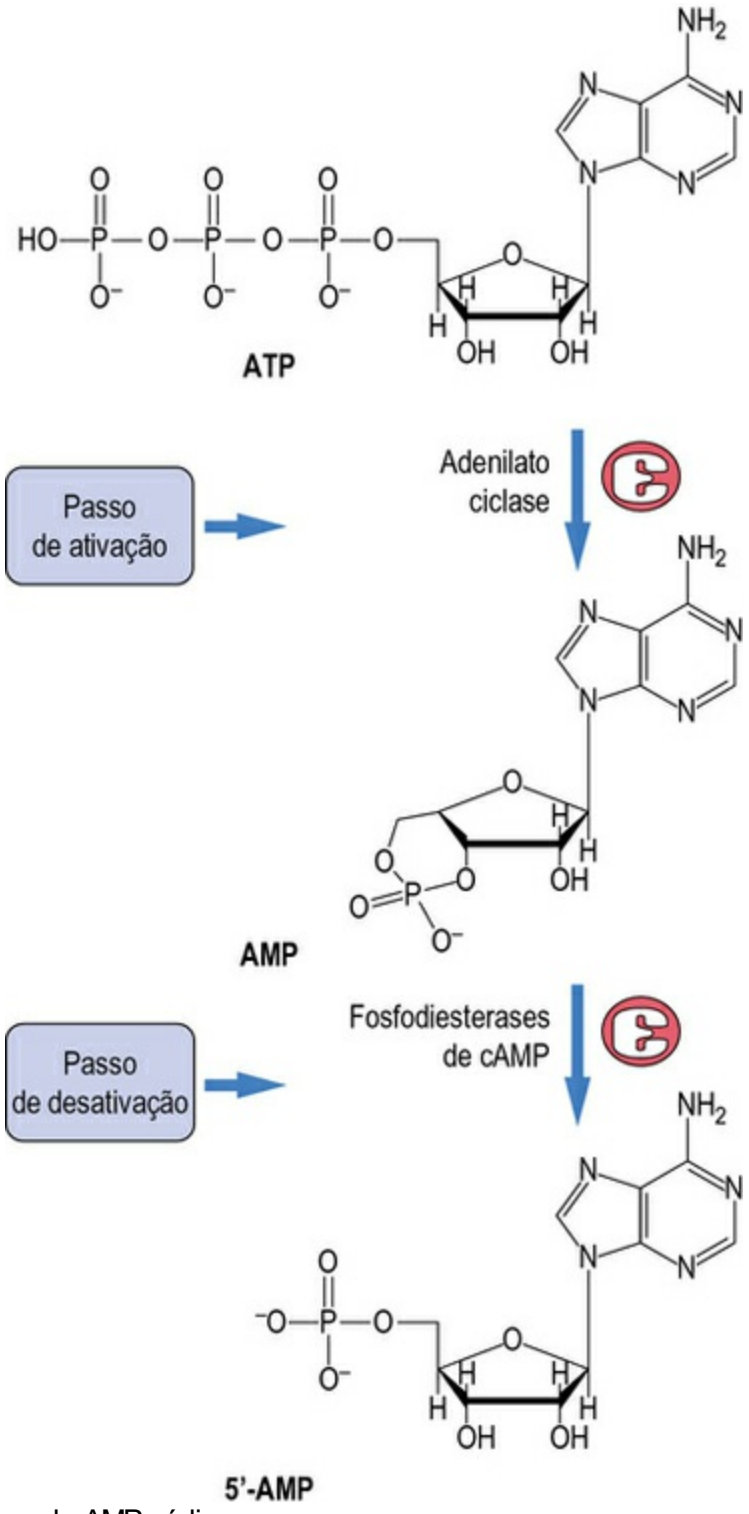


FIG. 40.4 Metabolismo do AMP cíclico.
A adenilato ciclase catalisa uma reação de ciclização para produzir o cAMP ativo, que é então desativado por fosfodiesterases de cAMP. cAMP, monofosfato de adenosina cíclico.

O glucagon e os receptores β-adrenérgicos estão acoplados ao cAMP

O glucagon e os receptores β-adrenérgicos estão acoplados à produção de cAMP. O hormônio β-adrenérgico epinefrina induz a degradação do glicogênio em glicose-1-fosfato no músculo e, em menor extensão, no fígado. A degradação do glicogênio no fígado é estimulada predominantemente pelo hormônio polipeptídico glucagon, o qual é secretado pelo pâncreas quando os níveis plasmáticos de glicose se encontram baixos (Caps. 13 e 21). Um dos primeiros eventos de sinalização após ligação desses hormônios

a seus receptores é a produção de cAMP. A importância do cAMP na regulação da degradação do glicogênio foi demonstrada por uma série de experimentos que mostraram não só que os hormônios que ativam a atividade da adenilato ciclase nas células hepáticas e musculares também estimulam a degradação do glicogênio, mas também demonstraram que os análogos de cAMP que permeiam as células, como o dibutiril cAMP, podem mimetizar os efeitos desses hormônios na indução da degradação do glicogênio.

A adenilato ciclase é ativada por subunidades α de proteínas G

Os receptores β-adrenérgicos e de glucagon são acoplados à ativação da adenilato ciclase pela ação de uma forma específica da subunidade α da proteína G, denominada $G_s\alpha$. Embora a hidrólise do GTP pela GTPase intrínseca da subunidade $G_s\alpha$ atue de forma a desligar a ativação da adenilato ciclase, o complexo hormônio-receptor também deve ser desativado para devolver a célula ao seu estado de repouso, não estimulado. No caso dos receptores β-adrenérgicos, essa dessensibilização do receptor, que ocorre após exposição prolongada ao hormônio, envolve fosforilação da cauda *C*-terminal do receptor β-adrenérgico ocupado pelo hormônio por uma cinase conhecida como cinase do receptor β-adrenérgico. Outros receptores acoplados a proteínas G, como os receptores α_2-adrenérgicos no músculo liso, atuam inibindo a adenilato ciclase e a produção de cAMP. Neste caso, os receptores estão acoplados a uma forma inibitória específica da subunidade α da proteína G, designada $G_i\alpha$ (Tabela 40.2), que inibe a atividade da adenilato ciclase, reduzindo as concentrações de cAMP.



Quadro de conceitos avançados

Toxinas bacterianas que têm como alvo as proteínas g causam várias doenças

Uma diversidade de toxinas bacterianas exerce seus efeitos tóxicos por modificação covalente de proteínas G e, como tal, modulação irreversível de sua função. Por exemplo, a **toxina colérica** do *Vibrio cholerae* contém uma enzima (subunidade A) que catalisa a transferência de ADP-ribose do NAD^+ intracelular para a subunidade α da G_s; essa modificação impede a hidrólise do GTP ligado à G_s, levando a uma forma constitutivamente (permanentemente) ativa da proteína G. O consequente aumento prolongado das concentrações de cAMP nas células do epitélio intestinal leva à fosforilação de canais de Cl^- mediada pela PKA, causando um grande efluxo de eletrólitos e de água para o interior do intestino, que é responsável pela diarreia grave característica da cólera. A ação da enterotoxina é iniciada pela ligação específica das subunidades B (ligantes) da toxina colérica (AB_5) à porção oligossacarídica do monossialogangliosídio, GM_1, nas células epiteliais. Um mecanismo molecular semelhante foi atribuído à ação da **enterotoxina termolábil,** toxina lábil secretada por diversas estirpes de *Escherichia coli*, responsáveis pela "diarreia do viajante".

Pelo contrário, a **toxina *pertussis*** (outra toxina AB_5) da *Bordetella pertussis*, o agente causador da coqueluche, catalisa a ADP-ribosilação da $G_{i\alpha}$, que impede a interação da $G_{i\alpha}$ com os receptores ativados. Assim, a proteína G é inativada e não consegue atuar inibindo a adenilato ciclase, ativando a PLA_2 ou a PLC, abrindo os canais de K^+ ou abrindo e fechando os canais de Ca^{2+}, causando o desacoplamento generalizado dos receptores de hormônios de suas cascatas de sinalização.

Os sinais podem ativar diferentes subtipos de receptores, com diferentes consequências

Os subtipos de receptores são expressos de uma forma específica do tecido para alguns sinais como a epinefrina e a angiotensina II. Estes diferentes subtipos de receptores podem se acoplar de diferentes modos; por exemplo, a epinefrina estimula a síntese de cAMP por meio de receptores β-adrenérgicos acoplados a $G_s\alpha$ no músculo esquelético, enquanto, no músculo liso, a epinefrina inibe a síntese de cAMP por receptores α-adrenérgicos acoplados à $G_i\alpha$. Assim, o mesmo sinal pode ter efeitos distintos nas cascatas de sinalização intracelulares, dependendo do tecido em análise.

Proteína cinase A

O cAMP transduz seus efeitos na interconversão glicogênio-glicose-1-fosfato por regulação de uma enzima-chave de sinalização, a proteína cinase A (PKA), que fosforila proteínas-alvo em resíduos de serina e treonina.

A proteína cinase A se liga ao cAMP e fosforila outras enzimas

A PKA é uma enzima multimérica que contém duas subunidades reguladoras (R) e duas catalíticas (C): a forma tetramérica R_2C_2 da PKA é inativa, porém a ligação de quatro moléculas de cAMP às subunidades R leva à liberação das subunidades C cataliticamente ativas, que podem então fosforilar e modular a atividade de duas enzimas-chave, a fosforilase cinase e a glicogênio sintase (Fig. 40.5), que estão envolvidas na regulação do metabolismo do glicogênio (Cap. 13).

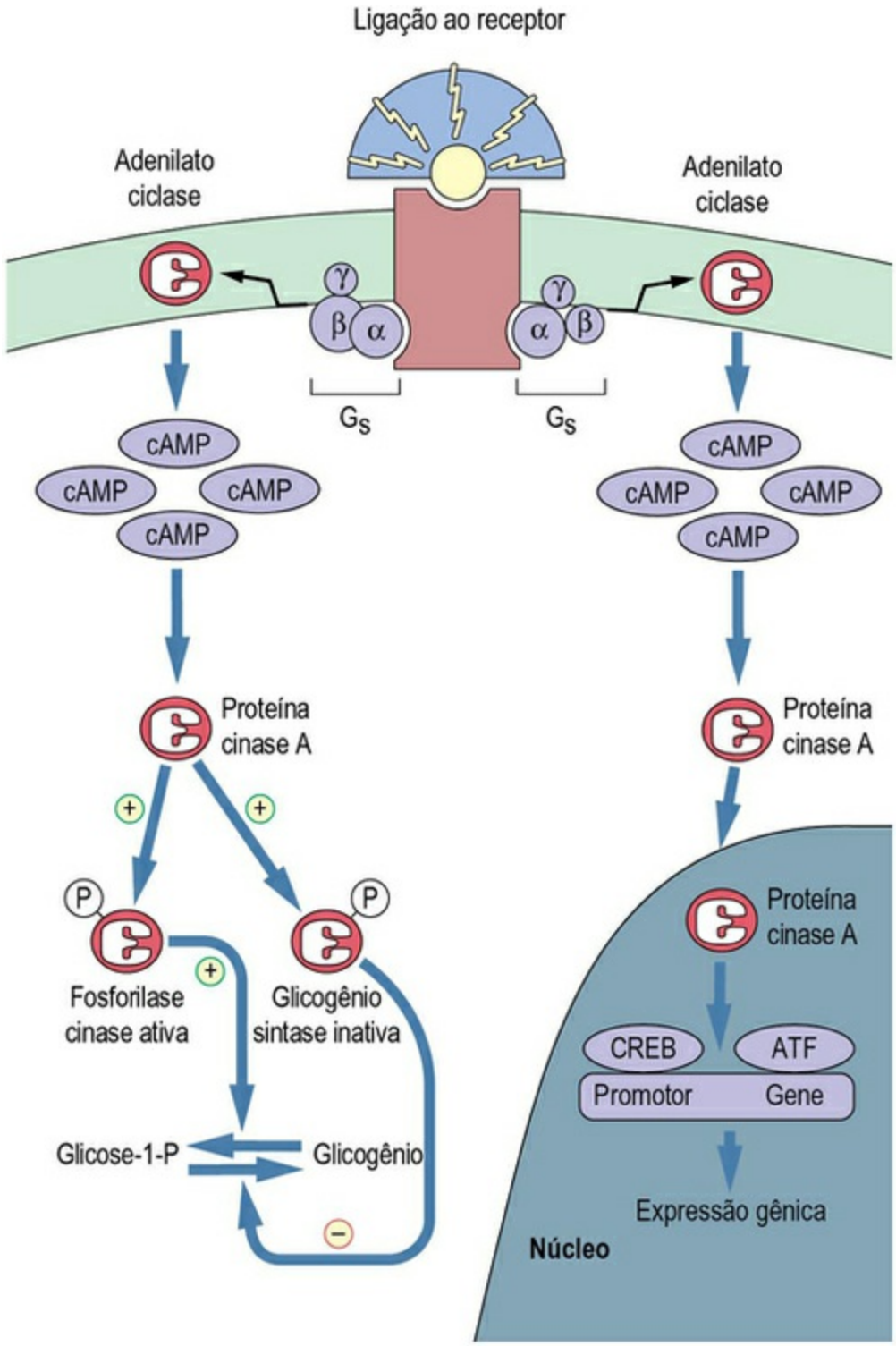


FIG. 40.5 A proteína cinase A (PKA) atua como uma enzima de sinalização para o segundo mensageiro, o cAMP.
A ligação de uma proteína G estimuladora (G_s) ao complexo hormônio-receptor ativa a adenilato ciclase, que catalisa a produção de cAMP. A PKA é ativada pela ligação de quatro moléculas de cAMP. A translocação da PKA para o núcleo modula a atividade de fatores de transcrição, como, por exemplo, do CREB e ATF (consulte o texto), levando à indução ou repressão da expressão gênica (compare com a Figura 13.6).

Muitas outras respostas celulares podem ser mediadas pela *cassette* de sinalização AMP-PKA

A fosforilação mediada pela PKA pode regular a atividade de diversos canais iônicos, como os canais de K^+, Cl^- e Ca^{2+}, e a de fosfatases envolvidas na regulação da sinalização

celular. Além disso, a translocação da PKA ativada para o núcleo possibilita a modulação da atividade de fatores de transcrição, como a proteína de ligação do elemento responsivo ao cAMP (CREB) ou as famílias de fatores de ativação de transcrição (ATF), levando à indução ou à repressão da expressão de genes específicos (Fig. 40.5 e Cap. 34).

O cAMP pode estimular a sinalização celular independente da PKA

Tornou-se claro que nem todas as ações do cAMP são mediadas pela PKA. O cAMP pode também se ligar às Epacs (proteínas de troca diretamente ativadas pelo cAMP), que são fatores de troca de nucleotídios de guanina para a pequena GTPase Rap. A ativação das Epacs foi implicada na ação anti-inflamatória do cAMP e no crescimento e desenvolvimento neuronais.

As cascatas de sinalização amplificam sinais iniciados pela ligação a receptores

As concentrações de hormônios e de outros sinais estão frequentemente na gama nanomolar (10^{-9} mol/L) ou picomolar (10^{-12} mol/L). Em consequência, é importante que o sinal seja amplificado. As cascatas de transdução de sinal com múltiplas camadas causam amplificação substancial do sinal original em cada estágio da cascata, assegurando que a ligação de apenas algumas moléculas de hormônio conduz a uma resposta biológica apropriada. Por exemplo, a estimulação da degradação de glicogênio pelo glucagon ou pela epinefrina envolve a amplificação do sinal ao nível das proteínas G, adenilato ciclase, proteína cinase A e fosforilase, de tal forma que são liberadas muitas moléculas de glicose-1-fosfato (Fig. 40.6).

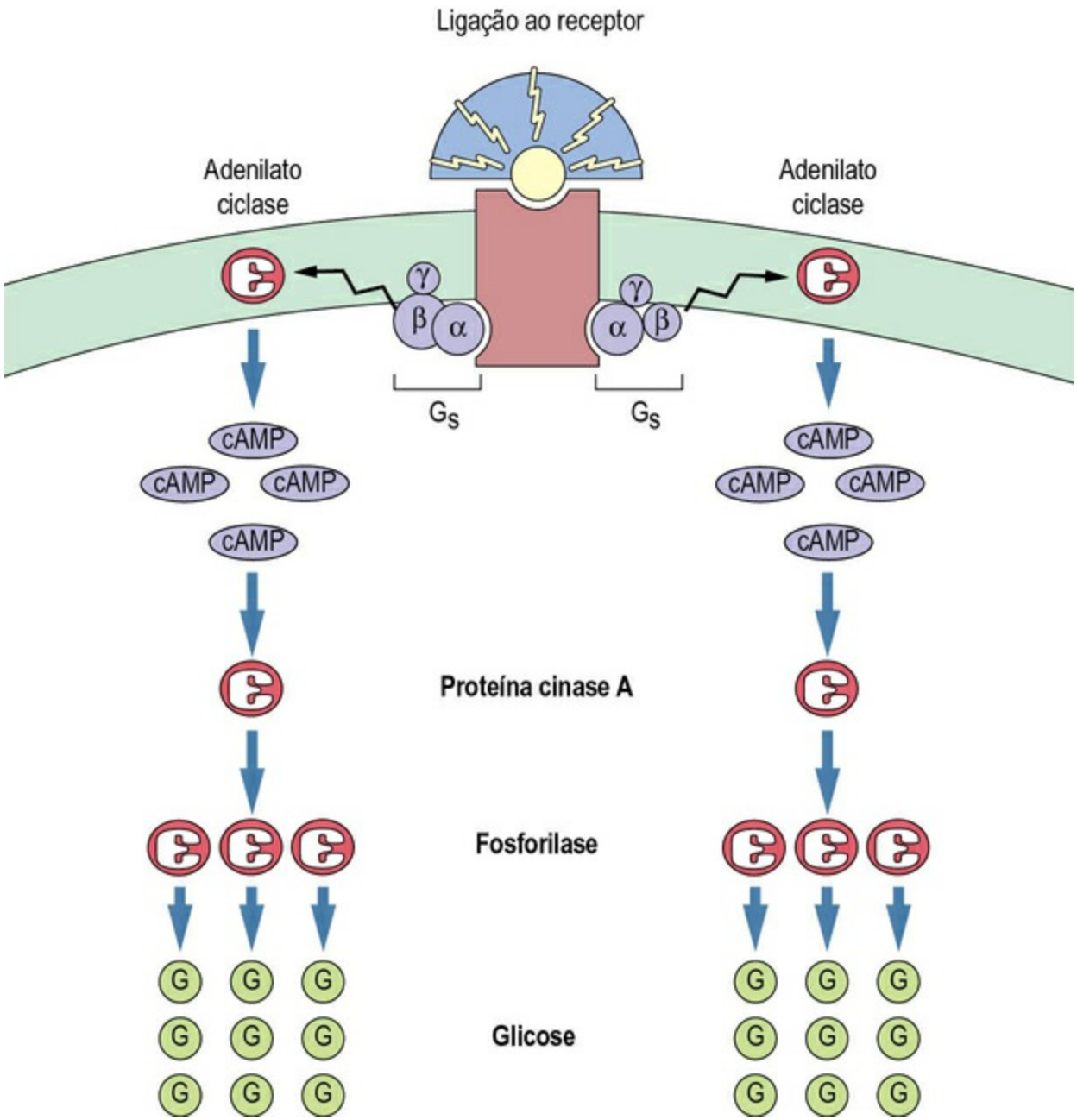


FIG. 40.6 A cascata de sinalização induz a amplificação do sinal hormonal. Cada complexo hormônio-receptor ativado pode estimular múltiplas moléculas G_s. Cada adenilato ciclase pode catalisar a formação de muitas moléculas de cAMP, e cada proteína cinase A pode ativar muitas moléculas de fosforilase, levando à quebra de glicogênio em muitas moléculas de glicose-1-fosfato como resultado da degradação de glicogênio (compare com a Figura 13.4).

As fosfodiesterases terminam o sinal do cAMP

As fosfodiesterases (PDEs) inativam o sinal do cAMP, convertendo-o no seu metabólito, o 5′-AMP (Fig. 40.4); assim, elas possuem o potencial de desempenhar papéis-chave na regulação de diversas respostas fisiológicas em muitas células e tecidos diferentes. Existem muitas isoformas diferentes de PDEs que exibem um padrão de expressão específico de tecido e diferente seletividade para o cAMP ou o GMPc. Demonstrou-se que as PDEs regulam a ativação plaquetária, o relaxamento vascular, a contração do músculo cardíaco e a inflamação.

Inibidores de fosfodiesterases são usados como agentes terapêuticos

Inibidores seletivos das PDEs têm sido usados como agentes terapêuticos para **asma** (metilxantinas), **disfunção erétil** (sildenafil) e **insuficiência cardíaca** (milrinona). A milrinona é seletiva para isoformas PDE_3, o que aumenta a força contrátil do coração, presumivelmente devido ao aumento das concentrações de cAMP e da atividade da PKA, levando à fosforilação dos canais de cálcio cardíacos e a um aumento subsequente da concentração intracelular de cálcio.



Quadro clínico

Insuficiência cardíaca — sinalização do receptor β-adrenérgico (βAR) como alvo potencial de terapia gênica?

A doença cardíaca é a principal causa de morte nos países desenvolvidos e, apesar dos avanços das terapias eletrofisiológicas e agentes farmacológicos, incluindo os bloqueadores do receptor β-adrenérgico (βAR) (comumente conhecidos como betabloqueadores), os inibidores da enzima conversora da angiotensina (IECAs) e os diuréticos, as anormalidades de transdução de sinal intracelular subjacentes ao desenvolvimento e à progressão da insuficiência cardíaca não são abordadas.

Normalmente, a ligação de catecolaminas (epinefrina e norepinefrina) aos βARs ativa a Gαs para estimular a adenilato ciclase e gerar cAMP, resultando na ativação da PKA e, em última instância, por meio do acoplamento excitação-contração mediado por cálcio, na regulação da frequência cardíaca (cronotropia), contratilidade (inotropia) e relaxamento (lusitropia). Em contraste, na insuficiência cardíaca, os miócitos exibem alterações características na sinalização do βAR e consequente mobilização de cálcio, resultando na redução da função contrátil. Especificamente, a expressão de βAR é reduzida e os receptores remanescentes parecem estar dessensibilizados devido ao aumento dos níveis do regulador negativo da sinalização do βAR, a βAR cinase (βARK). Além disso, foram identificados polimorfismos específicos (mutações) nos βARs, em humanos, que estão associados a mau prognóstico após a insuficiência cardíaca. Como consequência, muito interesse tem sido dedicado ao potencial terapêutico da modulação da sinalização por meio desta via por terapia gênica cardíaca.

A terapia gênica, na qual o material genético é introduzido diretamente na célula usando vetores virais, é a única abordagem que teria efetivamente como alvo as proteínas de sinalização nos cardiomiócitos, ao contrário dos fármacos que também têm ações em tecidos além do músculo cardíaco. Por exemplo, os estudos em modelos animais feitos até a data sugerem que existe um potencial valor terapêutico, em matéria de contratilidade e de sobrevivência dos miócitos, no aumento da expressão do β_2AR, mas não do β_1AR. Mais ainda, foi demonstrado que a expressão da sequência carboxiterminal da βARK (βARKct), a qual inibe a dessensibilização dos βARs mediados pela βARK, previne a insuficiência cardíaca em roedores. Da mesma forma, a superexpressão dos efetores a jusante da cascata do βAR, como a AC_{VI}, a principal

isoforma da adenilato ciclase no miocárdio, produziu efeitos terapêuticos. Finalmente, como o acoplamento do βAR à sinalização da PKA regula os receptores e os canais iônicos responsáveis pelos sinais de cálcio necessários ao acoplamento excitação-contração, reguladores inotrópicos *downstream* da função contrátil, como a Ca^{2+}-ATPase do retículo endoplasmático (SERCA2a) e a proteína 1 sensora das porções EF de cálcio (S100A1), que estão também reguladas negativamente na insuficiência cardíaca, também são atualmente estudados como potenciais alvos terapêuticos. De fato, ensaios clínicos usando adenovírus para aumentar a SERCA2a estão atualmente em curso em pacientes com insuficiência cardíaca avançada.

Segundos mensageiros derivados da fosfolipase

A fosfolipase C hidrolisa o fosfolipídio de membrana fosfatidilinositol 4,5-bifosfato para formar dois segundos mensageiros

Os receptores acoplados à proteínas G que estão conectadas à subunidade $G_q\alpha$ da subunidade α da proteína G estimulam a atividade da **fosfolipase C (PLC)**. Além disso, outros tipos de receptores de membrana, como o receptor do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), que possuem atividade intrínseca de tirosina cinase, também são capazes de estimular a PLC. A PLC catalisa a hidrólise de uma espécie menor de fosfolipídio, o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2). A hidrólise mediada pela PLC do PIP_2, que representa tipicamente 0,4% dos fosfolipídios totais nas membranas, gera dois segundos mensageiros: o **inositol-1,4,5-trifosfato** (IP_3) e o **diacilglicerol** (DAG) (Fig. 40.7). O IP_3, que é um produto hidrossolúvel liberado no citosol, demonstrou ser capaz de mobilizar os estoques intracelulares de cálcio. O DAG é um segundo mensageiro lipídico, que é ancorado à membrana plasmática em virtude de suas cadeias laterais compostas de ácidos graxos hidrofóbicos, ativa uma família-chave de enzimas de sinalização, conhecida como proteína cinase C (PKC).

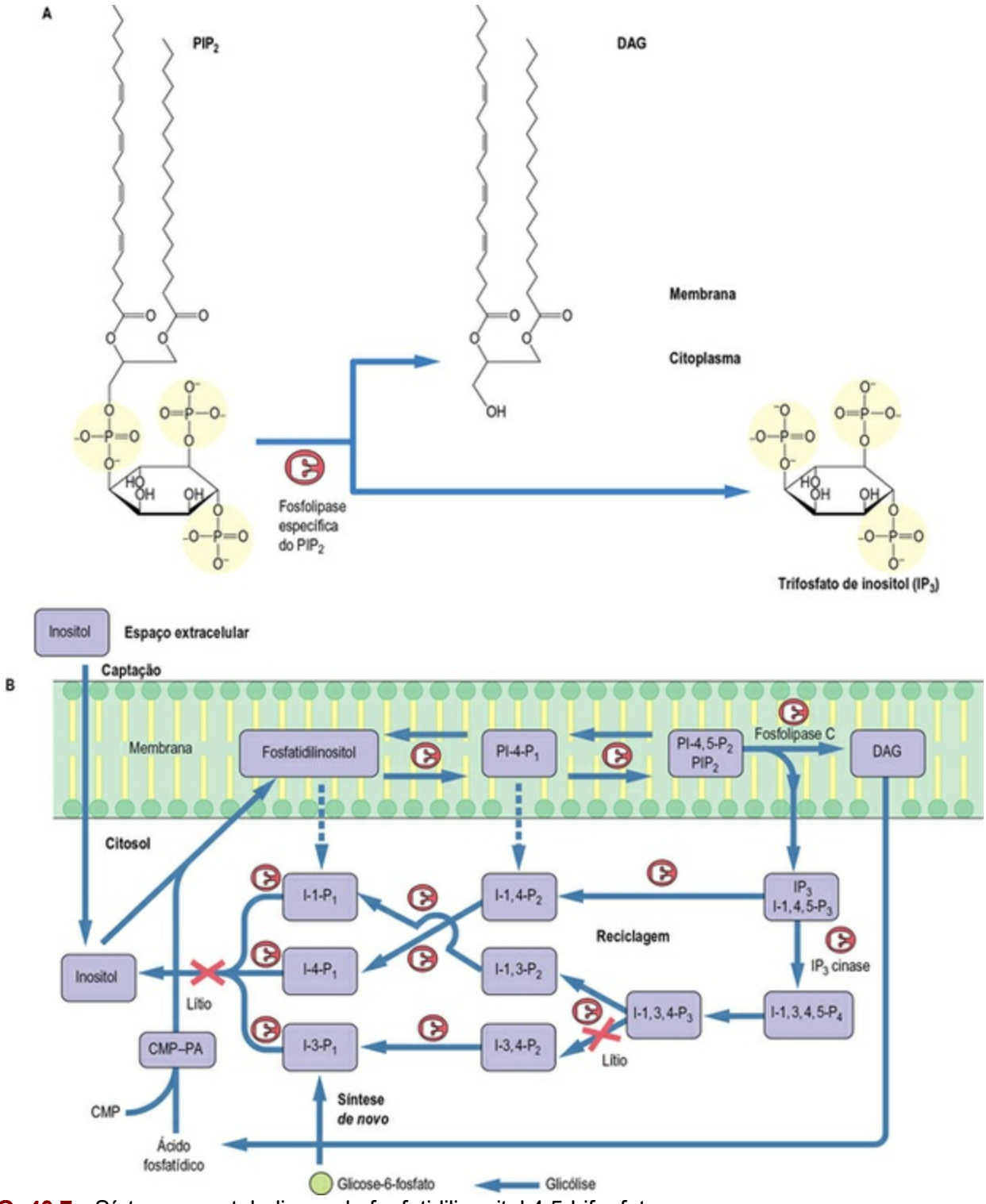


FIG. 40.7 Síntese e metabolismo do fosfatidilinositol 4,5-bifosfato.
O fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2) é hidrolisado por uma PLC específica para PIP_2, gerando dois segundos mensageiros: inositol-1,4,5-P_3 (IP_3) e DAG **(A).** O IP_3, que é liberado no citosol, demonstrou mobilizar os estoques intracelulares de cálcio. O DAG é um segundo mensageiro lipídico que é ancorado na membrana plasmática e ativa PKCs. O PIP_2 é produzido a partir do fosfatidilinositol pela fosfatidilinositol 4-cinase e a fosfatidilinositol 5-cinase **(B)**. O IP_3 é degradado pela (i) ação sequencial de fosfatases convertendo o Ins-1,4,5-P_3 em inositol, e (ii) uma IP_3 cinase, que forma inositol-1,3,4,5-P_4, que é, por sua vez, sequencialmente degradada a inositol por fosfatases específicas do fosfato de inositol, algumas das quais podem ser inibidas pelo lítio. DAG, diacilglicerol; PA, ácido fosfatídico; CMP-PA, monofosfato de citidina-ácido fosfatídico.

O inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) estimula a mobilização de cálcio intracelular

Uma vez sintetizado a partir do PIP_2, o IP_3 se liga a receptores encontrados no retículo endoplasmático de todas as células. Os receptores de IP_3 são uma família de glicoproteínas relacionadas (massa molecular 250 kDa), compreendendo seis domínios transmembranares. O receptor ativo é expresso como um multímero de quatro moléculas receptoras de IP_3 que atua como um canal de **Ca^{2+} regulado por ligantes**. A estrutura tetramérica do receptor do IP_3 ocasiona cooperatividade na atividade dos canais de Ca^{2+}. Estimou-se que a estimulação com IP_3 causa o transporte de 20-30 íons cálcio, revelando a amplificação inerente a esta cascata de sinalização. Consistentemente com a natureza transiente da liberação do cálcio intracelular que é observada após a ligação do hormônio ao receptor, as concentrações celulares de IP_3 retornam rapidamente aos valores de repouso (10 nmol/L) por mais de uma via de degradação (Fig. 40.7).

Cálcio e calmodulina. Transdução de sinal por íons cálcio

O cálcio (Ca^{2+}) é um mensageiro ubíquo com um importante papel na transdução de sinais, levando a diversas respostas celulares, como as alterações da motilidade celular, fertilização de ovos, neurotransmissão, secreção, diferenciação e proliferação celulares. As células despendem uma considerável quantidade de energia para manter um gradiente de concentração de Ca^{2+} de forma que a concentração de Ca^{2+} em células em repouso, não estimuladas, seja na ordem dos 10^{-7} mol/L, enquanto a concentração extracelular de Ca^{2+} é aproximadamente 10.000 vezes superior, tipicamente de 10^{-3} mol/L. Esse gradiente acentuado permite alterações rápidas, abruptas e transientes nas concentrações de Ca^{2+} em resposta a sinais. A ligação de ligantes por uma ampla variedade de receptores leva a um aumento rápido (em segundos) e transiente, mediado pela PLC, da concentração de Ca^{2+} intracelular para a faixa micromolar (compare com a Figura 8.4). As rápidas alterações nas concentrações de Ca^{2+} são rigidamente controladas e utilizam uma diversidade de mecanismos envolvendo a compartimentalização celular. Por exemplo, as concentrações intracelulares de Ca^{2+} podem ser reduzidas pelo sequestro de Ca^{2+} para o interior do retículo endoplasmático por Ca^{2+}-ATPases, ou para as mitocôndrias, utilizando o gradiente eletroquímico dependente de energia. Alternativamente, o Ca^{2+} livre pode ser quelado por proteínas ligantes de Ca^{2+}, como a calsequestrina.

Muitos eventos de sinalização a jusante mediados pelo Ca^{2+} são modulados por uma proteína sensora e ligante de Ca^{2+}, a calmodulina

A **calmodulina** (CaM) é uma proteína de 17 kDa encontrada em todas as células animais e vegetais (consistindo em até 1% da proteína celular). Ela pertence a uma família de proteínas caracterizadas por uma ou mais cópias de um motivo estrutural ligante do Ca^{2+}, chamado motivo EF (Fig. 40.8). A CaM é composta por dois domínios globulares similares ligados por uma α-hélice longa, com cada lobo globular contendo dois motivos EF/sítios ligantes de Ca^{2+} separados por uma distância de 1,1 nm (11 Å). A ligação de três ou quatro íons cálcio ocorre quando a concentração intracelular de cálcio está aumentada para aproximadamente 500 nmol/L, induzindo uma importante alteração conformacional

que permite que a CaM se ligue e modifique proteínas-alvo. A ligação de diversos íons cálcio permite a cooperatividade na ativação da CaM, de tal forma que pequenas alterações na concentração de Ca^{2+} causam grandes alterações na concentração de um complexo ativo Ca^{2+}/CaM, proporcionando a amplificação do sinal hormonal original.

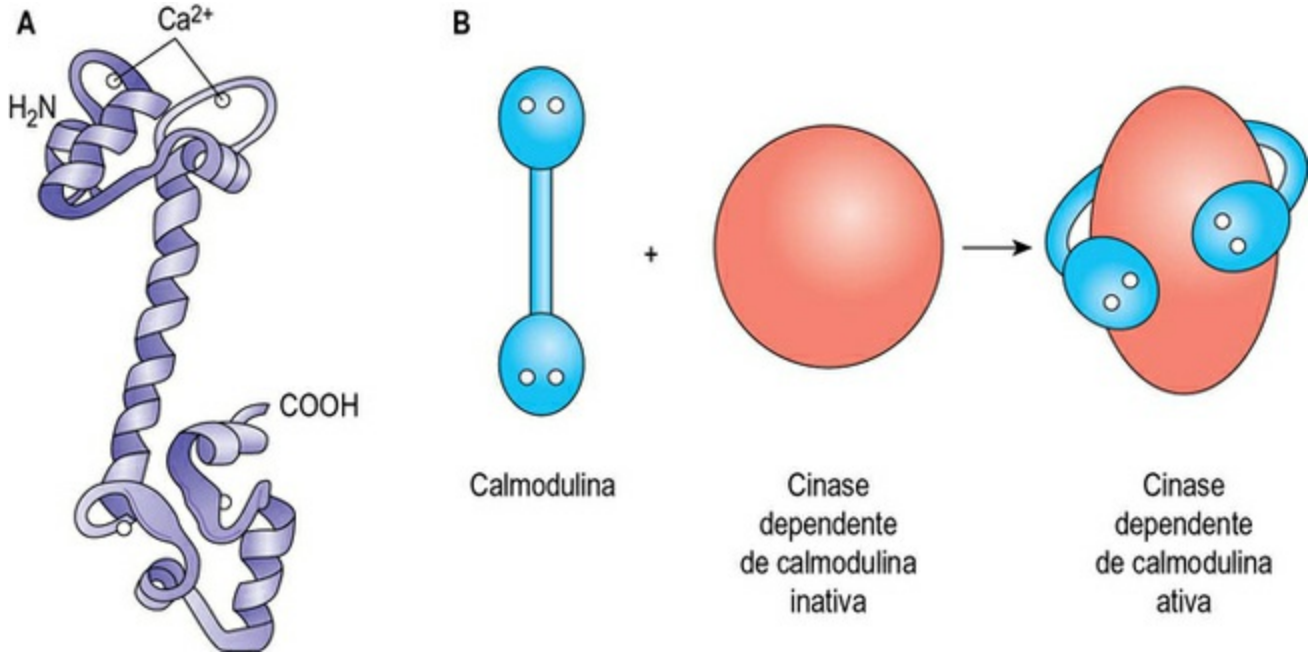


FIG. 40.8 Calmodulina.
(A) Estrutura da calmodulina. **(B)** A ligação de cálcio induz uma alteração conformacional, permitindo à calmodulina a ligação e a modificação da atividade de enzimas-alvo de sinalização.

A calmodulina tem uma vasta gama de efetores-alvo

A calmodulina tem grande quantidade de efetores-alvo, incluindo a óxido nítrico sintetase (NOS), que estimula a síntese de NO em resposta aos sinais mobilizadores de Ca^{2+}, e as proteínas cinases dependentes de Ca^{2+}/CaM, que fosforilam resíduos de serina-treonina em proteínas para regular uma variedade de processos. Por exemplo, a cinase de ampla especificidade, a Ca^{2+}/CaM-cinase II, está envolvida na regulação do metabolismo de combustíveis, na permeabilidade iônica, na biologia de neurotransmissores e na contração muscular. Interessantemente, a CaM funciona como uma subunidade reguladora permanente da fosforilase cinase e pode também regular efetores não cinases, como determinadas isoformas da adenilato ciclase e também PDEs específicas de cAMP, permitindo uma "conversa cruzada" entre as vias de sinalização dependentes de cAMP e de Ca^{2+}.

O diacilglicerol (DAG) ativa a proteína cinase C

O DAG cumpre seu papel de segundo mensageiro por ativação PKC, que fosforila uma grande variedade de proteínas-alvo de transdução de sinal em resíduos de serina ou treonina. A PKC foi originalmente identificada como uma cinase dependente de cálcio e de lipídios (fosfatidilserina) importante na regulação da proliferação celular. Contudo, recentemente, tornou-se claro que a PKC é, na realidade, um nome genérico para uma

superfamília de cinases relacionadas que têm diferentes requisitos de ativação (Tabela 40.3). Os membros da família da PKC também exibem expressão específica de tecido. No entanto, todas essas enzimas compartilham algumas características comuns; elas possuem, sobretudo, dois domínios principais: um domínio regulador *N*-terminal e um domínio cinase catalítico *C*-terminal. O domínio regulador contém uma sequência de pseudossubstrato que se assemelha ao sítio de fosforilação consenso nos substratos da PKC. Na ausência de cofatores ativantes (Ca^{2+}, fosfolipídio, DAG), essa sequência de pseudossubstrato interage com a fenda de ligação do substrato no domínio catalítico e reprime a atividade da PKC; a ligação de cofatores reduz a afinidade dessa interação, induz uma alteração conformacional na PKC e permite a estimulação da atividade da PKC. Consistente com o fato de que o ativador/cofator, DAG, está ancorado nas membranas, a ativação da PKC está geralmente associada à translocação do citosol para a membrana plasmática ou para as membranas nucleares.

Tabela 40.3

A superfamília das proteínas cinase C

	PKCs convencionais			Novas PKCs			PKCs atípicas		
	α	β	γ	δ	ε	η	θ	λ (ι no rato)	ζ
Sensíveis ao Ca^{2+}	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Sensíveis ao DAG	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não

Outras fosfolipases hidrolisam a fosfatidilcolina ou fosfatidiletanolamina, formando um conjunto de segundos mensageiros lipídicos

Foram identificadas vias de sinalização lipídica acopladas a receptores adicionais, envolvendo a hidrólise da fosfatidilcolina ou da fosfatidiletanolamina, que podem originar DAG e outros lipídios biologicamente ativos (Fig. 40.9) em resposta a uma grande variedade de fatores de crescimento e de mitógenos. A fosfatidilcolina representa aproximadamente 40% dos fosfolipídios celulares totais. Ela pode ser hidrolisada por fosfolipases distintas, formando uma diversidade de segundos mensageiros lipídicos, incluindo ácidos graxos como o ácido araquidônico (formado pela PLA_2), assim como diferentes espécies de DAG (formado pela PLC) e ácido fosfatídico (formado pela fosfolipase D [PLD]). Também foram reportadas atividades de fosfatidiletanolamina-PLD estimuladas por hormônios. Alguns hormônios ou fatores de crescimento podem estimular somente uma ou outra dessas fosfolipases, mas outros ligantes podem estimular todas essas vias após a ligação aos seus receptores específicos.

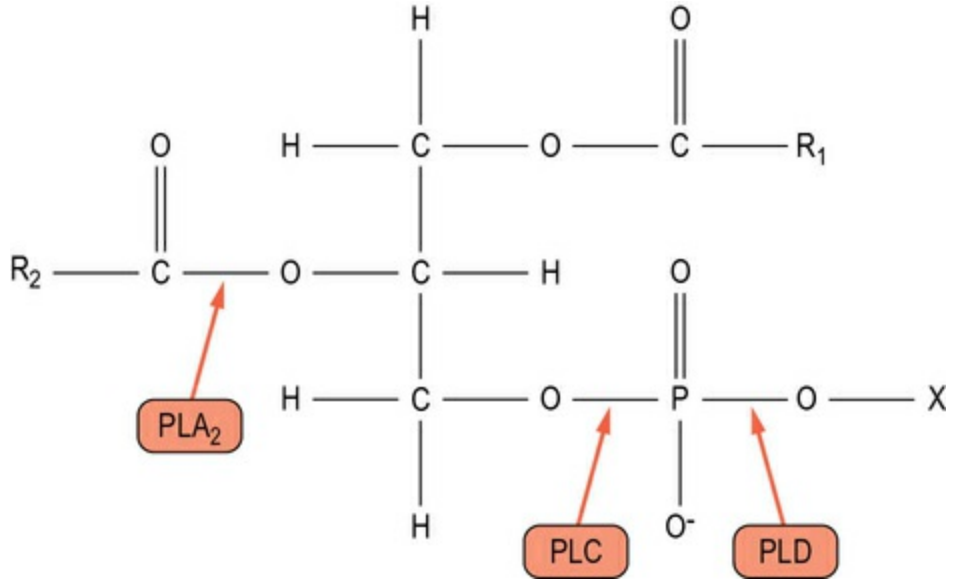


FIG. 40.9 Locais de ação das fosfolipases.
A hidrólise da fosfatidilcolina e da fosfatidiletanolamina pela fosfolipase A_2 (PLA_2) resulta na produção de lisofosfatidilcolina ou lisofosfatidiletanolamina e um ácido graxo. A hidrólise pela fosfolipase C (PLC) resulta na síntese de DAG e fosfocolina ou fosfoetanolamina. A hidrólise da fosfatidilcolina ou da fosfatidiletanolamina pela fosfolipase D (PLD) resulta na produção de ácido fosfatídico e de colina ou etanolamina. R1, R2: cadeias de ácidos graxos; X: colina/etanolamina.

Existem evidências crescentes de que todos esses segundos mensageiros lipídicos distintos possuem diferentes alvos. Por exemplo, foi sugerido recentemente que DAGs contendo ácidos graxos saturados/monoinsaturados derivados da ativação da PLD específica de fosfatidilcolina são incapazes de ativar isoformas da PKC e que somente as espécies de ácido estearoil-araquidonil-fosfatídico podem modular a atividade da GTPase *Ras* (Cap. 43). A produção desses segundos mensageiros lipídicos diversos, mas relacionados, fornece, portanto, um mecanismo para a iniciação ou o término das respostas específicas aos hormônios por meio de cascatas de transdutores de sinal particulares, incluindo a ativação diferencial das isoformas da PKC.

O ácido araquidônico é um segundo mensageiro que regula fosfolipases e proteínas cinases

O ácido araquidônico é um ácido graxo poli-insaturado C20 que contém quatro ligações duplas. Demonstrou-se que a síntese aumentada de ácido araquidônico regula várias enzimas de sinalização, incluindo a PLC e as isoformas PKC-α, β e γ. Além disso, o ácido araquidônico é um intermediário inflamatório-chave; no entanto, o ácido araquidônico envolvido nessas diversas funções parece ser gerado por duas vias de PLA_2 distintas. O ácido araquidônico formado para efeitos de sinalização parece derivar da ação de uma fosfolipase A_2 citosólica fosfatidilcolina-específica ($cPLA_2$), que possui uma massa molecular de 85 kDa e é regulada por fosforilação de resíduos-chave de serina. Em contraste, o ácido araquidônico inflamatório é gerado pela ação de uma família de proteínas PLA_2 secretoras ($sPLA_2$) de baixa massa molecular (14-18 kDa), que parecem ser ubíquas e são encontradas em elevadas concentrações no veneno de cobra e nos sucos pancreáticos. Adicionalmente, o ácido araquidônico pode ser gerado pela DAG lipase.

O ácido araquidônico é o precursor dos eicosanoides, que compreendem as prostaglandinas, as prostaciclinas, os tromboxanos e os leucotrienos

Como mediador inflamatório-chave, o ácido araquidônico é o principal precursor do grupo de moléculas denominadas eicosanoides, que compreende as **prostaglandinas,** as **prostaciclinas,** os **tromboxanos** e os **leucotrienos.** Os eicosanoides atuam como hormônios e sinalizam por meio de receptores acoplados a proteínas G. Eles possuem uma grande diversidade de atividades biológicas, incluindo a modulação da contração do músculo liso (tônus vascular), da agregação plaquetária, da secreção de ácido gástrico e do equilíbrio hidroeletrolítico, assim como a mediação da dor e das respostas inflamatórias. As prostaglandinas, prostaciclinas e os tromboxanos são sintetizados nas membranas a partir do ácido araquidônico pelas sucessivas ações de várias enzimas, começando com a ciclo-oxigenase (Fig. 40.10; Fig. 7.2).

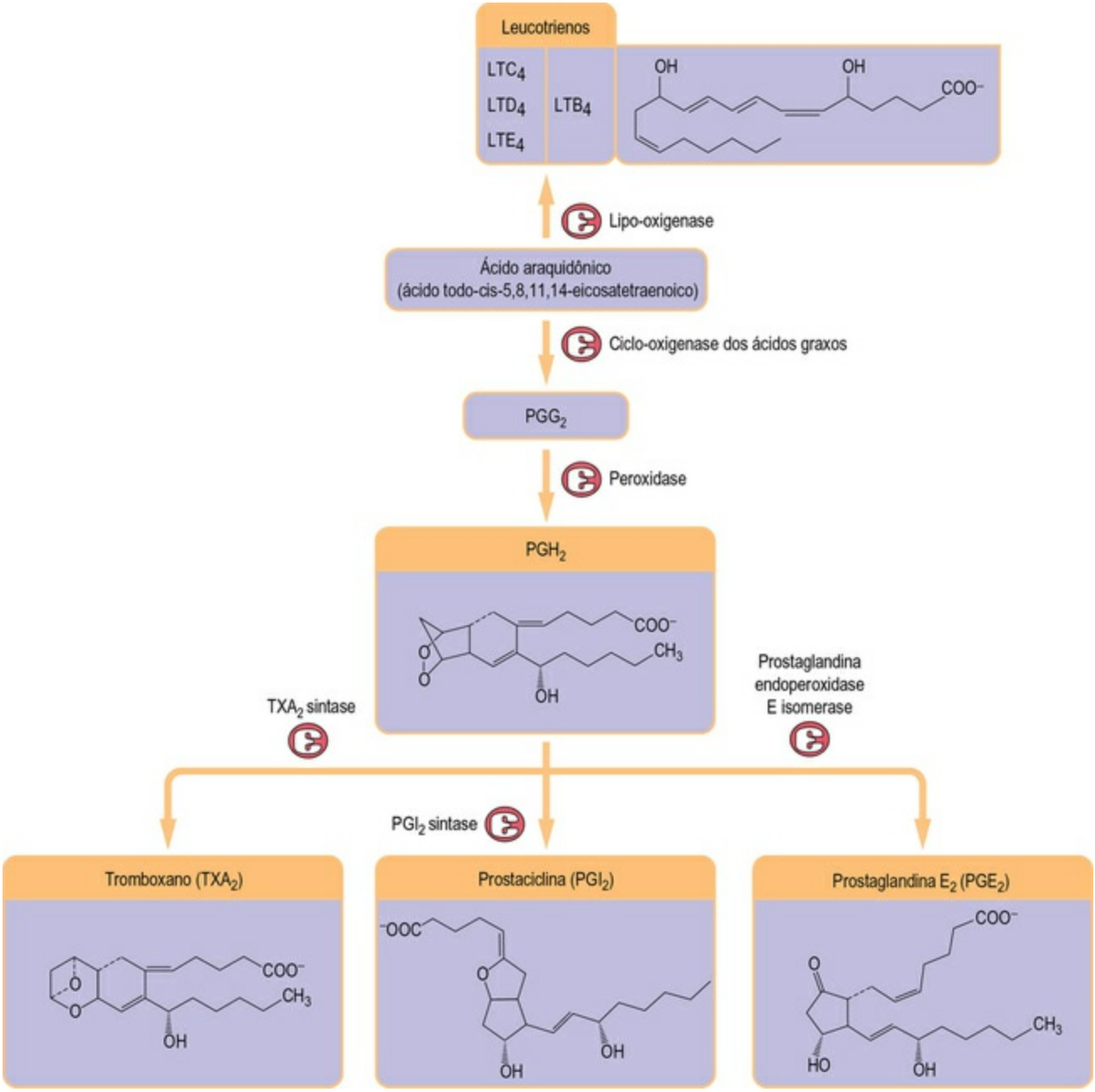


FIG. 40.10 Síntese de eicosanoides.
Os eicosanoides derivam principalmente do ácido araquidônico. Os leucotrienos (LT) são sintetizados por meio de uma via dependente da lipo-oxigenase, enquanto as prostaglandinas (PG), as prostaciclinas e os tromboxanos (TX) resultam de vias dependentes da ciclo-oxigenase.

Quadro clínico

Uma criança com desenvolvimento prematuro da mama: síndrome de McCune-Albright

Uma menina de 3 anos foi levada ao hospital devido à preocupação de sua mãe em relação ao desenvolvimento aparente de mama, ao longo dos últimos seis meses, e a uma mancha de sangue em suas roupas na semana anterior. No exame, ela apresentava estágio 3 de Tanner de desenvolvimento de mama. Em seu tronco, exibia três áreas de pigmentação "café com leite" na pele, com bordas ásperas.

Comentário

Essa criança sofre da síndrome de McCune-Albright. Ela está prestes a desenvolver displasia fibrosa poliostótica com áreas de adelgaçamento e esclerose nos ossos longos, que podem se fraturar. Outras endocrinopatias incluem tireotoxicose, hipersecreção de hormônio do crescimento, síndrome de Cushing (excesso de cortisol) e hiperparatireoidismo. A causa é uma mutação *missense* ativante do gene que codifica a subunidade $G_{s\alpha}$ da proteína G que estimula a formação de cAMP. O problema se apresenta na sequência de uma mutação celular somática com características clínicas dependentes de uma distribuição do tipo mosaico de células aberrantes. A incidência da síndrome é de 1 em cada 25.000.



Quadro clínico

Receptor 3 do fator de crescimento dos fibroblastos e acondroplasia

O receptor 3 (FGFR3) do fator de crescimento dos fibroblastos (FGF) é um receptor intrínseco de tirosina cinase com um importante papel na regulação do crescimento ósseo. Nos condrócitos (as células que sintetizam a cartilagem nas epífises dos ossos longos), a ligação do FGF a dois monômeros FGFR3 causa a dimerização do receptor, permitindo que os domínios tirosina cinase intracelulares se transfosforilem mutuamente. Esta autofosforilação do FGFR3 leva à ativação de vias de sinalização incluindo os fatores de transcrição, transdutores de sinal e ativadores da transcrição-1 (STAT1) e a pequena proteína G *Ras*, que subsequentemente ativa a cascata de proteínas cinases Raf-MEK-ERK. A ativação dessas vias inibe a diferenciação e a proliferação dos condrócitos. Assim, a estimulação do FGFR3 suprime o crescimento dos ossos longos, já que o reduzido número de condrócitos diminui a deposição de cartilagem que normalmente serviria como molde para os osteoblastos formarem o osso por ossificação.

A acondroplasia, caracterizada por estatura baixa e macrocefalia, tem uma incidência de 1 em cada 15.000-40.000 recém-nascidos. A maioria das pessoas com acondroplasia tem mutações no FGFR3 que aumentam sua atividade de tirosina cinase na ausência de FGF. Em consequência, a proliferação dos condrócitos e a deposição de cartilagem são comprometidas, levando a um reduzido tamanho dos ossos longos.

Resumo

- As células respondem especificamente a uma multiplicidade de sinais vindos de seu ambiente por meio de *cassettes* de transdução de sinal que contemplam receptores membranares de superfície celular específicos, sistemas de sinalização efetores (p. ex., adenilato ciclase, fosfolipases ou canais iônicos) e proteínas reguladoras (p. ex., proteínas G ou proteínas cinases).
- Essas *cassettes* de transdução de sinal servem para detectar, amplificar e integrar

diversos sinais externos para gerar a resposta celular apropriada.

- As famílias de receptores de superfície celular percebem e transduzem seu sinal hormonal específico pelo acoplamento transmembranar a diferentes sistemas efetores para gerar moléculas de baixo peso molecular, chamadas segundos mensageiros, como o cAMP, IP_3, DAG e Ca^{2+}, que medeiam suas funções de sinalização pela ativação de proteínas cinases-chave.
- A especificidade de uma resposta hormonal particular pode ser intensificada adicionalmente por uma variedade de atividades de sinalização das fosfolipases (PLC, PLD e PLA_2). Considerando sua gama de potenciais substratos lipídicos (p. ex., PIP_2, fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina) e produtos (p. ex., DAG, ácido fosfatídico e ácido araquidônico), as fosfolipases podem gerar uma diversa gama de segundos mensageiros lipídicos.

Questões para aprendizagem

1. Compare e diferencie um receptor para um hormônio polipeptídico e para um esteroide.
2. Descreva o mecanismo de sinalização das proteínas G.
3. Dê um exemplo de um receptor que possua atividade de proteína cinase e dos componentes de sua cascata de sinalização.
4. Comente a diversidade de enzimas fosfolipases.
5. Descreva o mecanismo de terminação da ativação por cAMP.

Leituras sugeridas

Fredholm, B. B., Hökfelt, T., Milligan, G. G-protein-coupled receptors: an update. *Acta Physiol (Oxf)*. 2007; 190:3–7.

Halls, M. L., Cooper, D. M. Regulation by Ca^{2+}-signaling pathways of adenylyl cyclases. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011; 3:a004143.

Houslay, M. D. Underpinning compartmentalised cAMP signaling through targeted cAMP breakdown. *Trends Biochem Sci*. 2010; 35:91–100.

Lefkowitz, R. J. Seven transmembrane receptors: something old, something new. *Acta Physiol (Oxf)*. 2007; 190:9–19.

Leto, D., Saltiel, A. R. Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012; 13:383–396.

Michel, T., Vanhoutte, P. M. Cellular signaling and NO production. *Pflugers Arch*. 2010; 459:807–816.

Osborne, J. K., Zaganjor, E., Cobb, M. H. Signal control through Raf: in sickness and in health. *Cell Res*. 2012; 22:14–22.

Parekh, A. B. Decoding cytosolic Ca^{2+} oscillations. *Trends Biochem Sci*. 2011; 36:78–87.

Smith, W. L. Nutritionally essential fatty acids and biologically indispensable cyclooxy genases. *Trends Biochem Sci*. 2008; 33:27–37.

Sites

Science magazine's signal transduction knowledge environment: www.stke.org

Kimball's biology pages: http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/C/CellSignaling.html

The Biology Project (University of Arizona): www.biology.arizona.edu/cell_bio/problem_sets/signaling/Index.htm

BioCarta's cell signaling pathways: www.biocarta.com/genes/CellSignaling.asp

Cell signaling pathway maps: www.cellsignal.com/reference/pathway/index.html

CAPÍTULO

41.1

Neurotransmissores

Simon J.R. Heales

Objetivos

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Delinear os critérios que devem ser preenchidos para que uma molécula seja classificada como um neurotransmissor.
- Identificar os principais tipos de neurotransmissores e estar ciente de que, apesar de algumas moléculas possuírem propriedades neurotransmissoras, elas não podem, no sentido exato, ser classificadas como neurotransmissores.
- Explicar a geração dos potencias de ação, avaliar como os neurotransmissores podem ser excitatórios ou inibitórios e resumir o processo pelo qual um neurotransmissor é liberado da célula pré-sináptica.
- Descrever os diferentes tipos de receptores de neurotransmissores e seu mecanismo de ação geral.
- Descrever as principais vias bioquímicas envolvidas na síntese e na degradação do neurotransmissor.
- Identificar alguns distúrbios clínicos que podem surgir como resultado do comprometimento do metabolismo do neurotransmissor.

Introdução

Os neurotransmissores são moléculas que atuam como sinalizadores químicos entre as células nervosas

As células nervosas se comunicam umas com as outras e com os tecidos-alvo por meio da secreção de mensageiros químicos, chamados neurotransmissores. Este capítulo descreve as diversas classes de neurotransmissores e como eles interagem com suas células-alvo. Discutiremos seus efeitos no organismo, como as alterações em sua sinalização podem

causar uma doença e como a manipulação farmacológica de suas concentrações pode ser usada terapeuticamente.

Definição de neurotransmissor

Tradicionalmente, para que uma molécula seja rotulada como neurotransmissor, alguns critérios devem ser preenchidos:

- A síntese da molécula ocorre no interior do neurônio, isto é, todas as enzimas de síntese, os substratos, os cofatores etc. devem estar presentes para a síntese *de novo*.
- O armazenamento da molécula ocorre no interior do terminal nervoso, (p. ex., nas vesículas sinápticas, antes de sua liberação).
- A secreção da molécula do terminal pré-sináptico ocorre em resposta a um estímulo apropriado, como um potencial de ação.
- Há ligação e reconhecimento da suposta molécula de neurotransmissor na célula pós-sináptica-alvo.
- Existência de mecanismos para a inativação e o término da atividade biológica do neurotransmissor.

O preenchimento rigoroso desses critérios significa que algumas moléculas que estão envolvidas na comunicação entre os neurônios não são, *stricto sensu*, classificadas como neurotransmissores. Assim, o óxido nítrico (NO), a adenosina, os neuroesteroides, as poliaminas etc. são frequentemente denominados **neuromoduladores**, em vez de neurotransmissores.

Classificação dos neurotransmissores

A Tabela 41.1.1 apresenta a classificação dos neurotransmissores com base na composição química. Muitos são derivados de compostos simples, como os aminoácidos (Tabela 41.1.2), mas atualmente os peptídios também são considerados de extrema importância. Os principais transmissores no sistema nervoso periférico são a norepinefrina e a acetilcolina (ACh) (Fig. 41.1.1).

Tabela 41.1.1

Classificação dos neurotransmissores

Grupo	Exemplos
Aminas	Acetilcolina (ACh), norepinefrina, epinefrina, dopamina, 5-HT
Aminoácidos	Glutamato, GABA
Purinas	ATP, adenosina
Gases	Óxido nítrico
Peptídios	Endorfinas, taquicininas, muitos outros

5-HT, 5-hidroxitriptamina; GABA, ácido γ-aminobutírico.

Os neurotransmissores podem ser classificados de diversas formas. O esquema mostrado baseia-se nas semelhanças químicas. Todos, exceto os peptídios, são sintetizados no terminal nervoso, onde são empacotados em vesículas. Os peptídios são sintetizados no corpo celular e transportados ao longo do axônio.

Tabela 41.1.2

Neurotransmissores de baixo peso molecular

Composto	Fonte	Local de produção
Aminoácidos		
Glutamato		Sistema nervoso central (SNC)
Aspartato		SNC
Glicina		Medula espinhal
Derivados de aminoácidos		
GABA	Glutamato	SNC
Histamina	Histidina	Hipotálamo
Norepinefrina	Tirosina	Nervos simpáticos, SNC
Epinefrina	Tirosina	Medula adrenal e alguns nervos do SNC
Dopamina	Tirosina	SNC
5-HT	Triptofano	SNC, células intestinais enterocromafins, nervos entéricos
Derivados de purinas		
ATP		Nervos sensoriais, entéricos, simpáticos
Adenosina	ATP	SNC, nervos periféricos
Gás		
Óxido nítrico	Arginina	Trato genitourinário, SNC
Miscelânea		
Acetilcolina	Colina	Nervos parassimpáticos, SNC

Muitos neurotransmissores são compostos simples, frequentemente derivados de aminoácidos comuns.

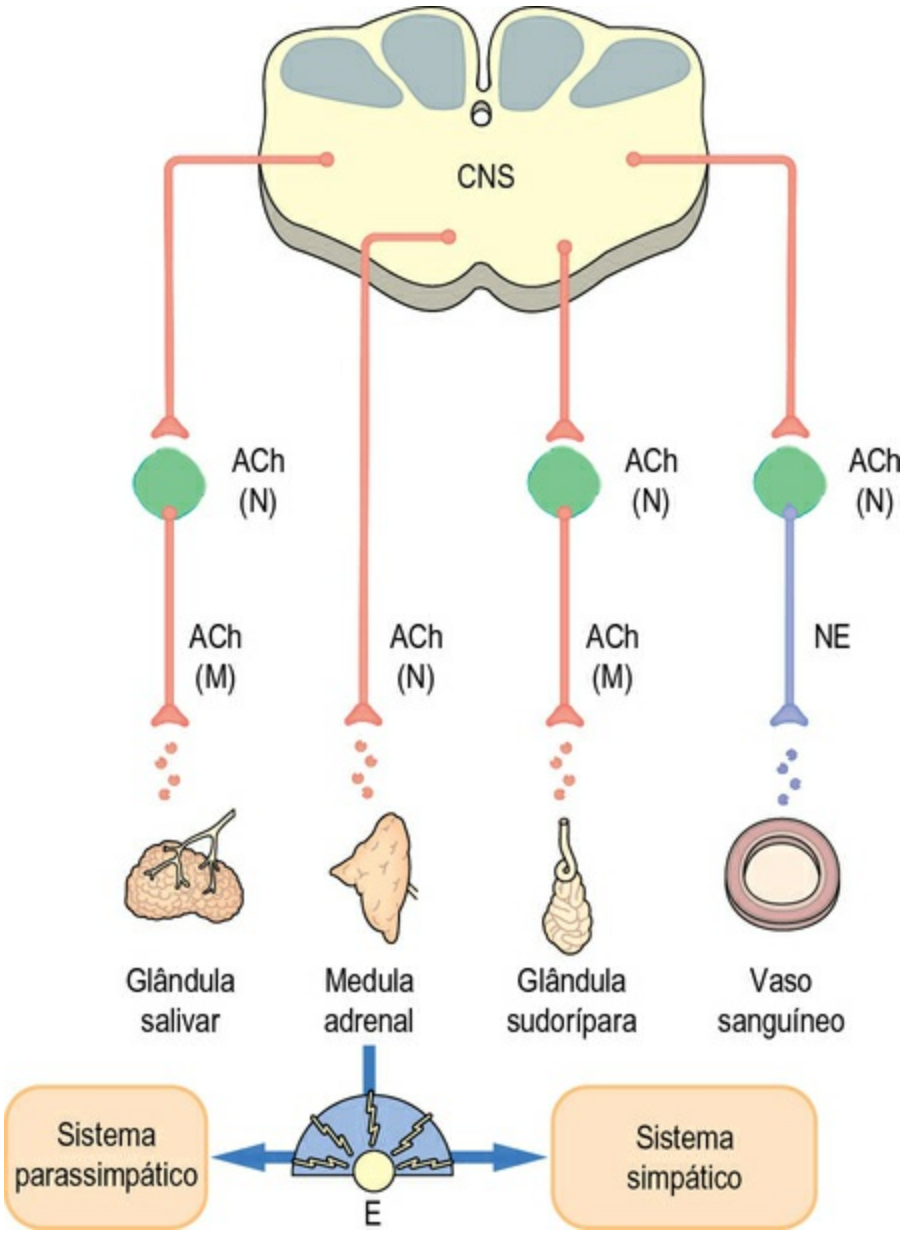


FIG. 41.1.1 Transmissores no sistema nervoso autônomo.
As **catecolaminas e a acetilcolina (ACh)** são transmissores do sistema nervoso **simpático** e do parassimpático. Todos os nervos pré-ganglionares secretam ACh, que se liga aos **receptores nicotínicos (N)**. A maioria dos nervos pós-ganglionares simpáticos secreta norepinefrina (NE), enquanto os nervos pós-ganglionares parassimpáticos liberam ACh, que age em **receptores muscarínicos (M)**. As glândulas suprarrenais liberam epinefrina. Os neurônios motores liberam ACh, que age em diferentes receptores nicotínicos. E, epinefrina (Fig. 41.1.3).

Diversos transmissores podem ser encontrados em um nervo

Um dogma antigo da função nervosa dizia que um nervo continha um único neurotransmissor. Entretanto, atualmente se sabe que isso é uma simplificação exagerada e que a combinação de transmissores é a regra. O padrão dos transmissores celulares pode caracterizar um papel funcional particular, porém detalhes sobre isso ainda são obscuros. Um transmissor importante, de baixo peso molecular, como uma amina, frequentemente está presente junto com diversos peptídios, um aminoácido e uma purina. Algumas vezes, pode até mesmo haver mais de um possível transmissor em uma determinada vesícula, como se acredita que seja o caso do trifosfato de adenosina (ATP) e da norepinefrina nos nervos simpáticos. Em alguns casos, a intensidade do estímulo

pode controlar qual transmissor será secretado, sendo que, frequentemente, os peptídios requerem maiores níveis de estímulo. Além disso, os diferentes transmissores podem apresentar sua ação em uma escala de tempo diferenciada. Os nervos simpáticos são bons exemplos de nervos que se encaixam nesse caso: acredita-se que o ATP provoque sua rápida excitação, enquanto a norepinefrina e o neuropeptídio Y (NPY) sejam responsáveis por uma fase mais lenta de ação. Em muitos tecidos, o NPY por si só pode ser capaz de produzir uma excitação muito lenta.

Neurotransmissão

Os potenciais de ação são causados pelas alterações no fluxo de íons através das membranas celulares

O sinal transmitido por uma célula nervosa reflete uma alteração abrupta na diferença de potencial de voltagem através da membrana celular. A diferença normal do **potencial de repouso** é de poucos milivolts, com o **interior da célula sendo negativo** devido a um desequilíbrio iônico através da membrana plasmática: a concentração do íon K^+ é maior no interior do que no exterior das células, enquanto o oposto é verdadeiro para os íons Na^+. Essa diferença é mantida pela ação da **Na^+/K^+-ATPase** (Cap. 24). Somente aqueles íons para os quais a membrana é permeável podem afetar o potencial, já que eles podem atingir um estado eletroquímico estável sob a influência combinada das diferenças de concentração e de voltagem. Como as membranas em todas as células em repouso são comparativamente permeáveis ao íon K^+ como resultado da presença dos canais de K^+ independentes de voltagem (vazamento), esse íon controla o potencial de repouso.

Uma alteração na voltagem, que tende a direcionar o potencial de repouso em direção a zero, a partir da voltagem negativa normal, é conhecida como despolarização, enquanto um processo que aumenta o potencial negativo é chamado hiperpolarização

Até agora, esse quadro é comum a todas as células. Entretanto, as células nervosas contêm canais de sódio dependentes de voltagem que se abrem rapidamente quando uma alteração despolarizante na voltagem é aplicada. Quando eles se abrem, permitem a entrada de grande quantidade de íons Na^+, provenientes do líquido extracelular (Fig. 41.1.2), que alteram o potencial de repouso e direcionam o potencial de membrana a valores positivos. Essa reversão de voltagem é o **potencial de ação**. Quase imediatamente, os canais de sódio se fecham e os canais de potássio denominados tardios se abrem. Esse mecanismo restaura o balanço iônico normal de repouso ao longo da membrana e, após um curto período refratário, a célula pode conduzir outro potencial de ação. Nesse meio-tempo, o potencial de ação se espalha por condutância elétrica para o segmento seguinte da membrana nervosa, e o ciclo completo novamente se inicia.

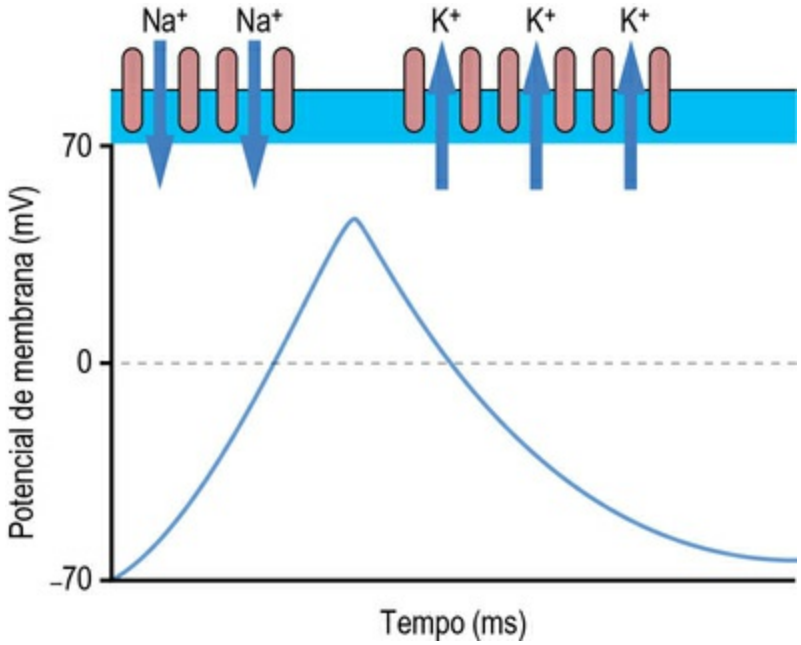


FIG. 41.1.2 Geração do potencial de ação.
O potencial de ação é formado da seguinte forma. No início do potencial de ação, a membrana está no potencial de repouso de aproximadamente −70 mV. Esse potencial é mantido pelos canais de K^+ independentes de voltagem. Quando um impulso é iniciado por um sinal de um neurotransmissor, os canais de Na^+ dependentes de voltagem se abrem. Isso permite o influxo de íon Na^+, que altera o potencial de membrana para valores positivos. Os canais de Na^+ então se fecham e os canais de K^+, chamados canais retificadores tardios, se abrem para restaurar o balanço inicial dos íons e o potencial de membrana negativo.

Os neurotransmissores alteram a atividade de vários canais iônicos, levando a alterações do potencial de membrana

Os neurotransmissores **excitatórios** causam uma alteração **despolarizante** na voltagem e, nesse caso, é mais provável ocorrer um potencial de ação. Por outro lado, os transmissores **inibitórios hiperpolarizam** a membrana, o que diminui a probabilidade de um potencial de ação ocorrer.

Os neurotransmissores atuam em sinapses

Os neurotransmissores são secretados no espaço entre as células em uma área especializada conhecida como sinapse (Fig. 41.1.3). No caso mais simples, os neurotransmissores se difundem da membrana pré-sináptica para o espaço ou fenda sináptica e se ligam aos receptores na membrana pós-sináptica. Entretanto, muitos neurônios, particularmente os que contêm aminas, possuem diversas varicosidades ao longo do axônio contendo transmissores. Essas varicosidades podem não estar próximas a uma célula vizinha, de tal forma que o neurotransmissor liberado a partir delas pode afetar muitos neurônios. Os nervos que inervam a musculatura lisa geralmente são desse tipo.

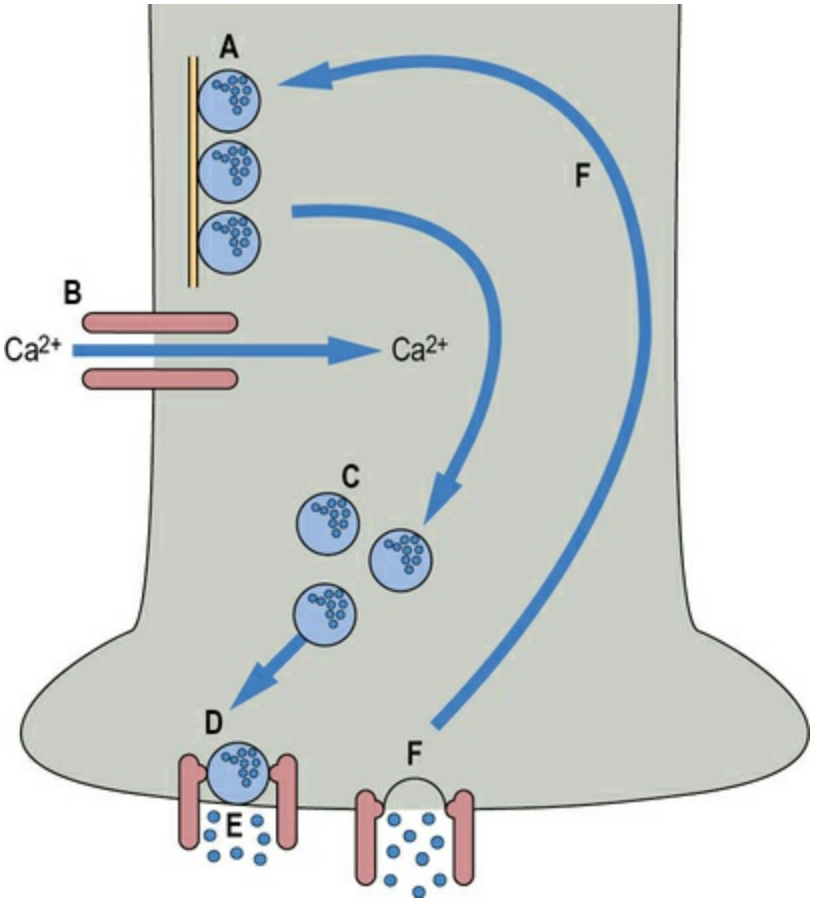


FIG. 41.1.3 Secreção dos neurotransmissores.
Os neurotransmissores são secretados das vesículas na membrana sináptica. **(A)** No estado de repouso, as vesículas encontram-se ligadas aos microtúbulos. **(B)** Quando um potencial de ação é recebido, os canais de cálcio se abrem. **(C)** As vesículas se movem para a membrana plasmática e **(D)** ligam-se a um complexo de proteínas de ancoragem. **(E)** O neurotransmissor é secretado e **(F)** as vesículas são recicladas.

Quando o potencial de ação chega ao final do axônio, a alteração da voltagem leva à abertura dos canais de cálcio. A entrada de cálcio é essencial para a mobilização das vesículas contendo o transmissor e para sua fusão com a membrana sináptica e secreção a partir dela.

Devido ao fato de os transmissores serem secretados das vesículas, os impulsos chegam à célula pós-sináptica em "pacotes" individuais ou *quanta*. Na junção neuromuscular entre os nervos e as células da musculatura esquelética, grande quantidade de vesículas é descarregada de uma vez e, assim, um único impulso pode ser suficiente para estimular a contração da célula muscular. Entretanto, o número de vesículas liberadas nas sinapses entre os neurônios é muito menor; consequentemente, a célula receptora será estimulada somente se a soma algébrica total dos diversos estímulos positivos e negativos exceder o limiar. O fato de cada célula no encéfalo receber aferências de um grande número de neurônios implica maior capacidade para controle fino das respostas no sistema nervoso central (SNC) do que a existente na junção neuromuscular.

Receptores

Os neurotransmissores atuam ligando-se a receptores específicos e abrindo ou fechando canais iônicos

Existem vários mecanismos pelos quais os receptores para os neurotransmissores excitatórios podem causar a propagação de um potencial de ação em um neurônio pós-sináptico. Direta ou indiretamente, eles causam alterações no fluxo iônico através da membrana, até que o potencial atinja o ponto crítico, ou limiar, para a iniciação de um potencial de ação. Os receptores que controlam diretamente a abertura de um canal iônico são chamados de **ionotrópicos,** enquanto os receptores **metabotrópicos** causam alterações em sistemas de segundos mensageiros que, por sua vez, alteram a função de canais que são separados do receptor.

Receptores ionotrópicos (canais iônicos)

Os receptores ionotrópicos contêm um canal iônico no interior de sua estrutura (Fig. 41.1.4; Cap. 8). Os exemplos incluem o **receptor nicotínico de ACh** e alguns **receptores** de glutamato e **do ácido γ-aminobutírico (GABA)**. Esses receptores são proteínas transmembrana com várias subunidades, geralmente cinco, circundando o poro através da membrana. Cada subunidade possui quatro regiões transmembrana. Quando o ligante se liga, ocorre uma alteração na estrutura tridimensional do complexo que permite o fluxo de íons através dele. O efeito no potencial de membrana depende de quais íons têm permissão de passar pelo canal: os receptores nicotínicos de ACh são relativamente não específicos para sódio e potássio e causam despolarização, enquanto o receptor $GABA_A$ é um canal de cloreto e causa hiperpolarização.

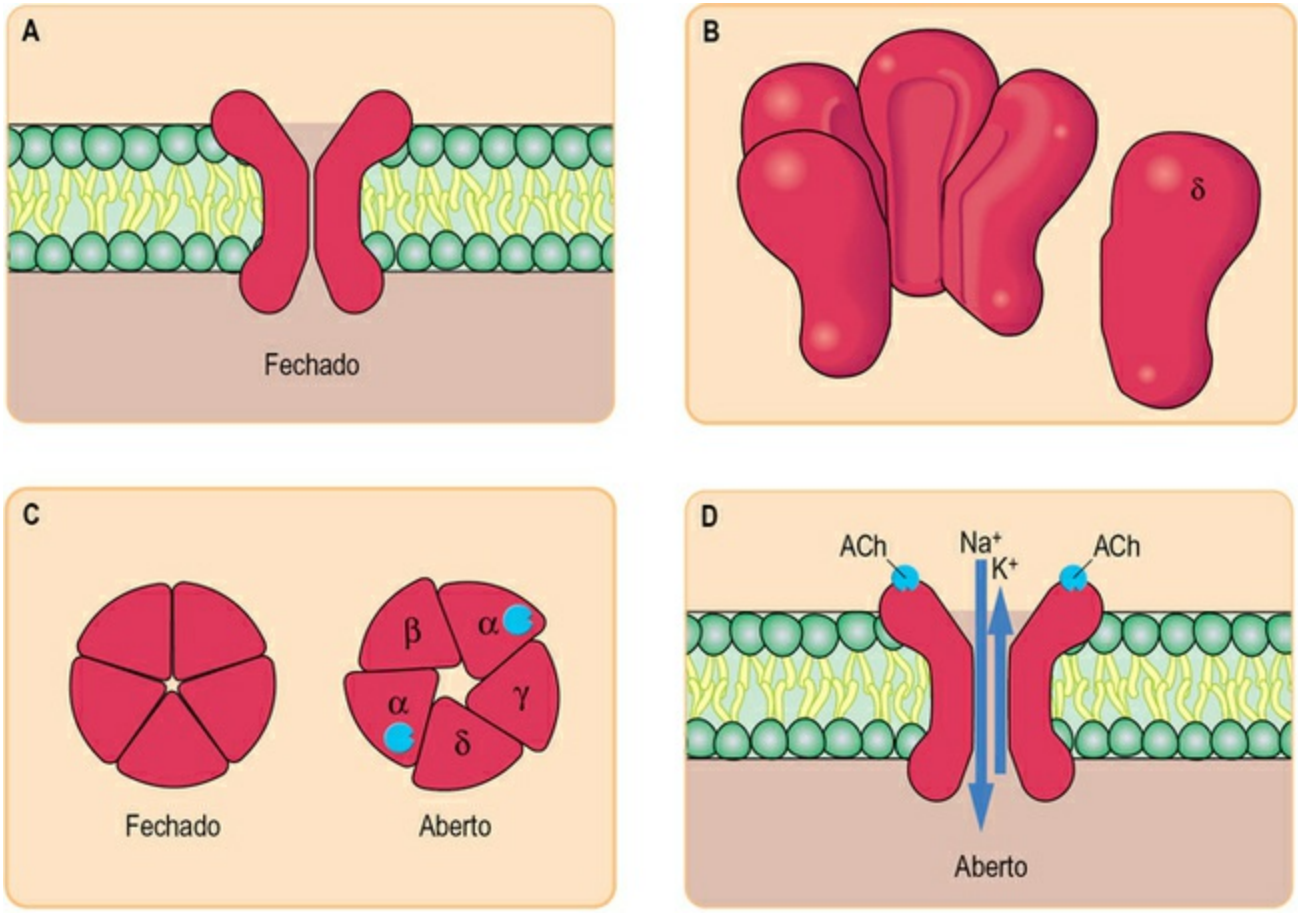


FIG. 41.1.4 Mecanismo de ação dos receptores ionotrópicos.
Os receptores ionotrópicos abrem diretamente os canais iônicos (na verdade, eles próprios são canais iônicos). O exemplo mais bem estudado é o receptor nicotínico de ACh. Esse receptor é uma proteína transmembrana **(A)** consistindo em cinco subunidades não idênticas **(B)**, cada uma cruzando diretamente a membrana. As subunidades circundam um poro **(C)** que permite a passagem seletiva de determinados íons quando é aberto por um ligante **(D)**.

Receptores metabotrópicos

Todos os receptores metabotrópicos conhecidos são acoplados às proteínas G

Os receptores metabotrópicos são acoplados às vias de segundos mensageiros e agem mais lentamente do que os receptores ionotrópicos. Todos os receptores metabotrópicos conhecidos são acoplados às proteínas G (Cap. 40) e, da mesma forma que os receptores de hormônios, têm sete regiões transmembrana. Normalmente, esses receptores estão acoplados à adenilil ciclase, alterando a produção de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP), ou à via do fosfatidilinositol, que altera o fluxo de cálcio. Canais iônicos separados do receptor são normalmente modificados pela fosforilação. Por exemplo, o receptor β-adrenérgico, que responde à norepinefrina e à epinefrina (Fig. 13.5), causa um aumento do cAMP, que estimula uma cinase a fosforilar e ativar um canal de cálcio. Alguns dos receptores muscarínicos da ACh têm efeitos semelhantes nos canais de K^+.

Regulação dos neurotransmissores

A ação dos transmissores é interrompida por meio da sua remoção da fenda

sináptica

Quando os transmissores terminam sua função, eles devem ser removidos do espaço sináptico. A difusão simples é provavelmente o principal mecanismo de remoção dos neuropeptídios. Enzimas como as **acetilcolinesterases**, que clivam a ACh, podem destruir qualquer transmissor remanescente. Os neurotransmissores excedentes podem também ser captados pelo neurônio pré-sináptico para serem reutilizados, e essa é a maior rota de remoção de catecolaminas e aminoácidos. A interferência na captura causa um aumento na concentração do transmissor na fenda sináptica, o que frequentemente tem consequências terapêuticas úteis.

As concentrações dos neurotransmissores podem ser manipuladas

Os efeitos dos neurotransmissores podem ser alterados pela modificação de suas concentrações efetivas ou pela alteração no número de receptores. As concentrações podem ser modificadas por:

- alterações na velocidade de síntese;
- alterações na taxa de liberação na sinapse;
- bloqueio da recaptação;
- bloqueio da degradação.

As modificações no número de receptores podem estar envolvidas em adaptações de longo prazo à administração dos fármacos.

Classes de neurotransmissores

Aminoácidos

Provar que os aminoácidos são verdadeiros neurotransmissores é uma tarefa particularmente difícil. Como os aminoácidos estão presentes em altas concentrações, em razão de suas funções metabólicas, a simples dosagem de suas concentrações não é uma evidência conclusiva. Os estudos farmacológicos de respostas a diferentes análogos e a clonagem de receptores específicos forneceram a prova definitiva.

Glutamato

O glutamato é o principal transmissor excitatório no SNC

O glutamato age tanto em receptores ionotrópicos quanto metabotrópicos. Clinicamente, o receptor caracterizado *in vitro* pela ligação do ***N*-metil-d-aspartato (NMDA)** é particularmente importante (Fig. 41.1.5).

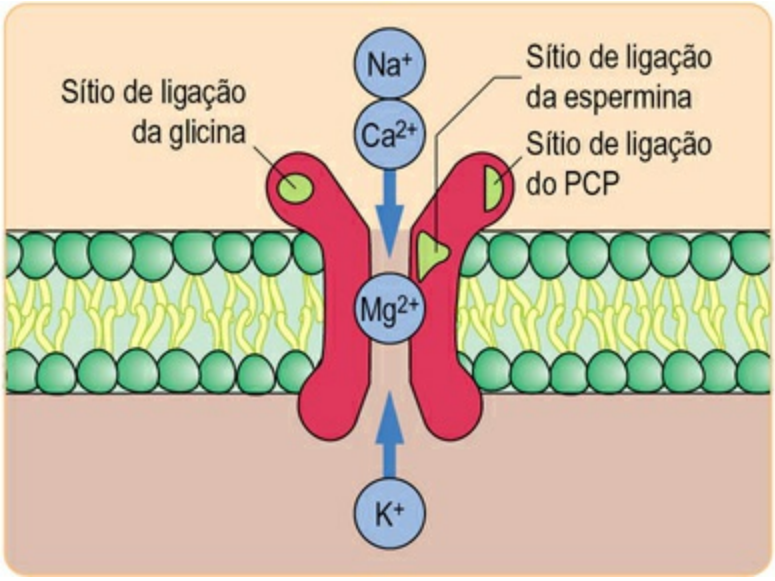


FIG. 41.1.5 Receptor NMDA de glutamato.
O receptor de glutamato que liga o *N*-metil-D-aspartato (NMDA) é complexo e clinicamente importante, já que pode causar dano aos neurônios após o acidente vascular (excitotoxicidade). Ele contém diversos sítios de ligação modulatórios, de tal forma que é possível o desenvolvimento de fármacos que podem alterar sua função. A glicina é um cofator obrigatório, da mesma forma que as poliaminas, como a espermina. O magnésio bloqueia fisiologicamente o canal no potencial de repouso, de modo que o canal pode abrir somente quando a célula foi parcialmente despolarizada por um estímulo independente. O magnésio, portanto, prolonga a excitação. Esse receptor também se liga à fenciclidina (PCP). Como esse fármaco de abuso pode causar sintomas psicóticos, é possível que uma disfunção das vias envolvendo os receptores NMDA cause alguns dos sintomas da esquizofrenia.

O hipocampo (Fig. 41.1.6) é uma área do sistema límbico do encéfalo que está envolvida na emoção e na memória. Determinadas vias sinápticas do hipocampo tornam-se mais ativas quando estimuladas cronicamente, um fenômeno conhecido como potencialização de longo prazo. Isso representa um modelo possível para explicar a fixação da memória e requer a ativação do receptor NMDA e o consequente influxo de cálcio.

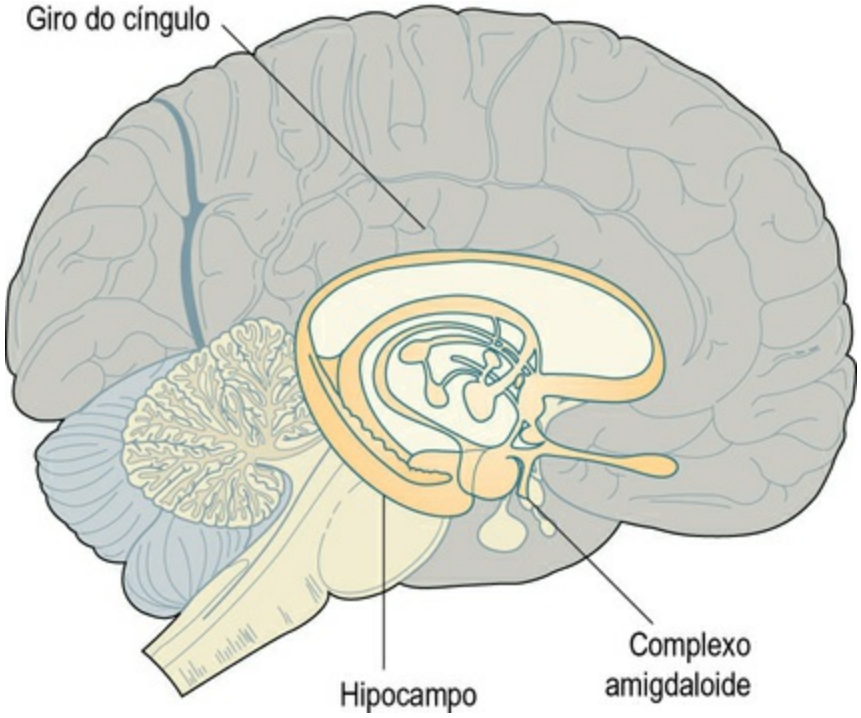


FIG. 41.1.6 Sistema límbico.
O sistema límbico do encéfalo está envolvido nas emoções e na memória. Ele consiste em várias áreas que circundam o tronco encefálico superior, incluindo o hipocampo, o corpo amigdaloide e o giro do cíngulo. A remoção do hipocampo impede a fixação da memória de curta duração, enquanto a função amigdaloide intacta é necessária para a sensação de medo.

O glutamato é reciclado por transportadores de alta afinidade no interior dos neurônios e de células gliais. As células gliais convertem o glutamato em glutamina, que depois retorna por difusão para o interior do neurônio. A glutaminase mitocondrial no neurônio regenera o glutamato para reutilização.

Glutamato e excitotoxicidade

A concentração extracelular de glutamato aumenta após **trauma** e **acidente vascular**, durante convulsões graves e em algumas doenças encefálicas orgânicas, como a **coreia de Huntington,** a **demência associada à AIDS** e a **doença de Parkinson**. Esse aumento é devido à liberação de glutamato a partir das células danificadas e ao dano das vias de recaptação de glutamato.

O excesso de glutamato é tóxico para as células nervosas

A ativação do receptor NMDA permite a entrada de cálcio nas células, o que ativa diversas proteases que, por sua vez, iniciam as vias de morte celular programada ou **apoptose** (Cap. 42). Além disso, podem ocorrer alterações em outros receptores ionotrópicos de glutamato que também causam captura anormal de cálcio. A captura dos íons sódio também está envolvida e causa o inchamento das células. A ativação dos receptores NMDA também aumenta a produção de NO que, por si só, pode ser tóxico. A morte celular em alguns modelos de excitotoxicidade pode ser prevenida com o uso de inibidores da produção de NO, porém não está claro qual o mecanismo dessa toxicidade.

São realizados esforços almejando o desenvolvimento de fármacos que inibem a ativação do receptor NMDA e que suprimem a excitotoxicidade. Espera-se, assim, que o

dano causado pelo acidente vascular possa ser limitado ou até revertido. Infelizmente, muitos desses fármacos apresentam efeitos adversos, uma vez que se ligam ao sítio de ligação da fenciclidina e resultam em efeitos psicológicos desagradáveis, como paranoia e alucinações.

O ácido γ-aminobutírico (GABA)

O GABA é sintetizado a partir do glutamato pela enzima glutamato descarboxilase

O GABA (Fig. 41.1.7) é o principal transmissor inibitório do encéfalo. São conhecidos dois receptores de GABA: o receptor $GABA_A$, que é ionotrópico, e o $GABA_B$, que é metabotrópico. O receptor $GABA_A$ consiste em cinco subunidades provenientes de diversas famílias de genes, o que gera um grande número de receptores com diferentes afinidades de ligação. Esse receptor é o alvo de diversos importantes fármacos utilizados na terapêutica. Os **benzodiazepínicos**, por exemplo, se ligam ao receptor $GABA_A$ e potencializam a resposta do GABA endógeno; assim, esses fármacos reduzem a ansiedade e também causam relaxamento muscular. Os **barbitúricos** também se ligam ao receptor GABA e o estimulam diretamente, mesmo na ausência de GABA. Em função dessa falta de dependência do ligante endógeno, esses agentes têm maior probabilidade de causar efeitos tóxicos colaterais no caso de sobredosagem.

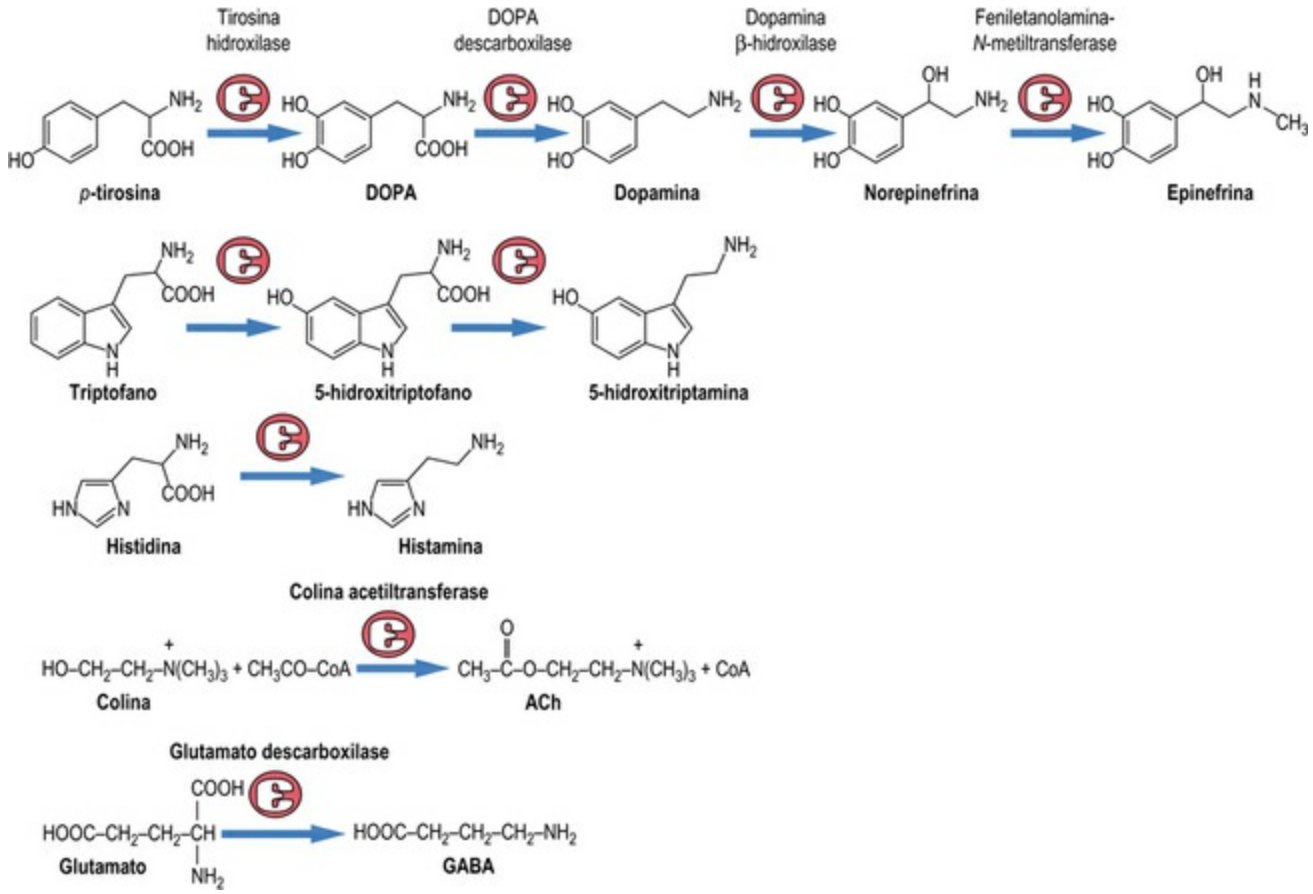


FIG. 41.1.7 Síntese de neurotransmissores e seus precursores.
O aminoácido tirosina é o precursor da dopamina, norepinefrina e epinefrina. O triptofano é o precursor da serotonina (5-hidroxitriptamina) e a histamina deriva do aminoácido histidina. A colina, um aminoálcool, é o precursor da acetilcolina, e o ácido glutâmico, o aminoácido comum, é o precursor do GABA.

Glicina

A glicina é encontrada principalmente nos interneurônios inibitórios da medula espinhal, onde bloqueia os impulsos que migram ao longo da medula para os neurônios motores que estimulam o músculo esquelético. O receptor de glicina nos neurônios motores é ionotrópico e é bloqueado pela estricnina, que permite a propagação dos impulsos sem um controle negativo, que contribuem para a rigidez e as convulsões causadas por essa toxina.

Catecolaminas

A norepinefrina, a epinefrina e a dopamina, conhecidas como catecolaminas, são derivadas do aminoácido tirosina (Fig. 41.1.7). Assim como com outros compostos que contêm grupos amina, como a serotonina, elas também são conhecidas como aminas biogênicas. Os nervos que liberam as catecolaminas têm varicosidades ao longo do axônio, em vez de uma única área de secreção na extremidade. O transmissor é secretado a partir das varicosidades e se difunde através do espaço extracelular até que encontre um receptor. Isso permite que o transmissor afete uma grande área do tecido, e acredita-se que esses compostos possuam um efeito modulatório geral nas funções cerebrais

gerais, como o humor e o alerta.

Norepinefrina e epinefrina

A norepinefrina (também conhecida como noradrenalina) é o principal transmissor no sistema nervoso simpático

Os nervos simpáticos originam-se na medula espinhal e correm para os gânglios situados perto da medula, a partir dos quais nervos pós-ganglionares correm para o tecido-alvo. A norepinefrina (Fig. 41.1.7) é o transmissor para esses nervos pós-ganglionares, enquanto a ACh é o transmissor no gânglio intermediário. A estimulação desses nervos é responsável por diversas características da resposta de "luta ou fuga", como estimulação da frequência cardíaca, sudorese, vasoconstrição na pele e broncodilatação.

Também existem neurônios contendo norepinefrina no SNC, principalmente no tronco encefálico (Fig. 41.1.8). Seus axônios se estendem em uma ampla rede por todo o córtex e alteram o estado geral de alerta ou atenção. Os efeitos estimulatórios das **anfetaminas** são causados por sua grande semelhança química com as catecolaminas.

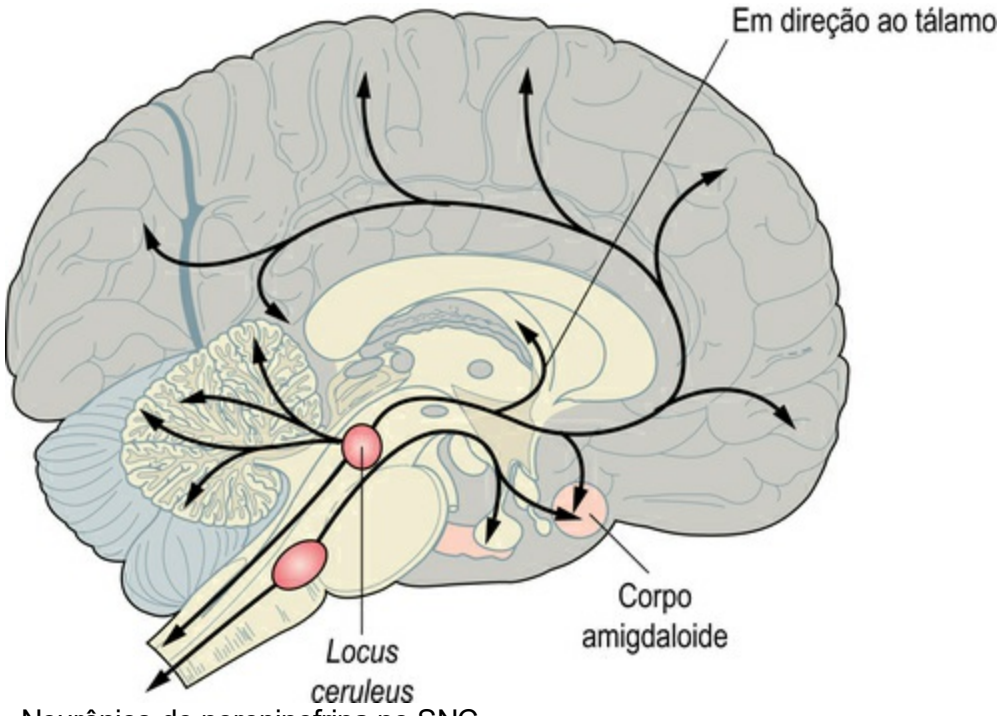


FIG. 41.1.8 Neurônios de norepinefrina no SNC.
Os neurônios que contêm norepinefrina se originam no *locus ceruleus*, no tronco encefálico, e se distribuem por todo o córtex.



Quadro clínico

Homem com dor de cabeça grave e hipertensão

Um homem de 50 anos sofre de depressão há algum tempo. Sua doença foi tratada com tranilcipromina, um inibidor da monoamina oxidase dos tipos A e B. Ele

desenvolveu uma cefaleia grave e latejante e sua pressão arterial era de 200/110 mmHg. A única ocorrência incomum foi sua participação em um coquetel, na noite anterior, no qual ele comeu salgadinhos com queijo e bebeu diversos copos de vinho tinto.

Comentário

O paciente apresentou uma crise hipertensiva causada pela interação entre o alimento ingerido e o fármaco que ele vinha recebendo – um inibidor da MAO. Esse fármaco inibe a principal enzima que catboliza as catecolaminas. Diversos alimentos, incluindo queijos, arenque em conserva e vinho tinto, contêm uma amina chamada tiramina, que possui estrutura semelhante à dos transmissores aminérgicos naturais e também é catabolizada pela MAO. Se essa enzima não é funcional, as concentrações de tiramina aumentam e ela começa a atuar como um neurotransmissor. Isso pode causar uma crise hipertensiva, conforme ocorreu nesse paciente.

A epinefrina (também conhecida como adrenalina) é produzida pela medula adrenal sob influência dos nervos que contêm ACh análogos aos nervos pré-ganglionares simpáticos

A epinefrina é mais ativa do que a norepinefrina no coração e nos pulmões, causa redirecionamento do sangue da pele para o músculo esquelético e tem efeitos estimulatórios importantes no metabolismo do glicogênio no fígado. Em resposta à epinefrina, um suprimento extra de glicose é disponibilizado para o músculo, sendo que o coração e os pulmões trabalham mais intensamente para bombear oxigênio pela circulação, e o organismo está então preparado para correr ou para se defender (Cap. 21). No entanto, a epinefrina não é essencial para a vida, uma vez que é possível remover a medula adrenal sem consequências graves.

Os receptores para norepinefrina e epinefrina são chamados **adrenoceptores** (Fig. 13.5). Com base na sua farmacologia, eles são divididos em classes e subclasses de receptores do tipo α e β. A epinefrina atua em todas as classes de receptores, porém a norepinefrina é mais específica para os receptores do tipo α. Os **β-bloqueadores**, como o atenolol, são utilizados no tratamento da **hipertensão** e da dor no peito (angina) na **doença cardíaca isquêmica**, já que eles antagonizam os efeitos estimulatórios das catecolaminas no coração. Os ***α*-bloqueadores** inespecíficos têm uso limitado, apesar de os α_1-bloqueadores mais específicos, como o prazosin, e os α_2-bloqueadores, como a clonidina, poderem ser utilizados na **hipertensão.** Certas subclasses de receptores do tipo β são encontradas em determinados tecidos. Por exemplo, o receptor β_2 está presente nos pulmões, e os **agonistas do receptor β_2**, como o **salbutamol**, são, portanto, utilizados na produção da dilatação brônquica na asma, sem a estimulação do receptor-β_1 do coração.

A norepinefrina é captada pelas células por um transportador de alta afinidade e catabolizada pela enzima monoamina oxidase (MAO). Ocorrem, a seguir, reações de oxidação e de metilação pela catecol-*O*-metiltransferase (COMT) que convertem esses produtos em **metanefrinas e em ácido vanilmandélico (ácido 4-hidroxi-3-metoximandélico)** (Fig. 41.1.9), os quais podem ser quantificados na urina como índice da

função da medula adrenal. Esses compostos estão particularmente aumentados em pacientes portadores de tumor da medula adrenal, conhecido como feocromocitoma. Esse tumor causa hipertensão devido à ação vasoconstritora das catecolaminas produzidas por ele.

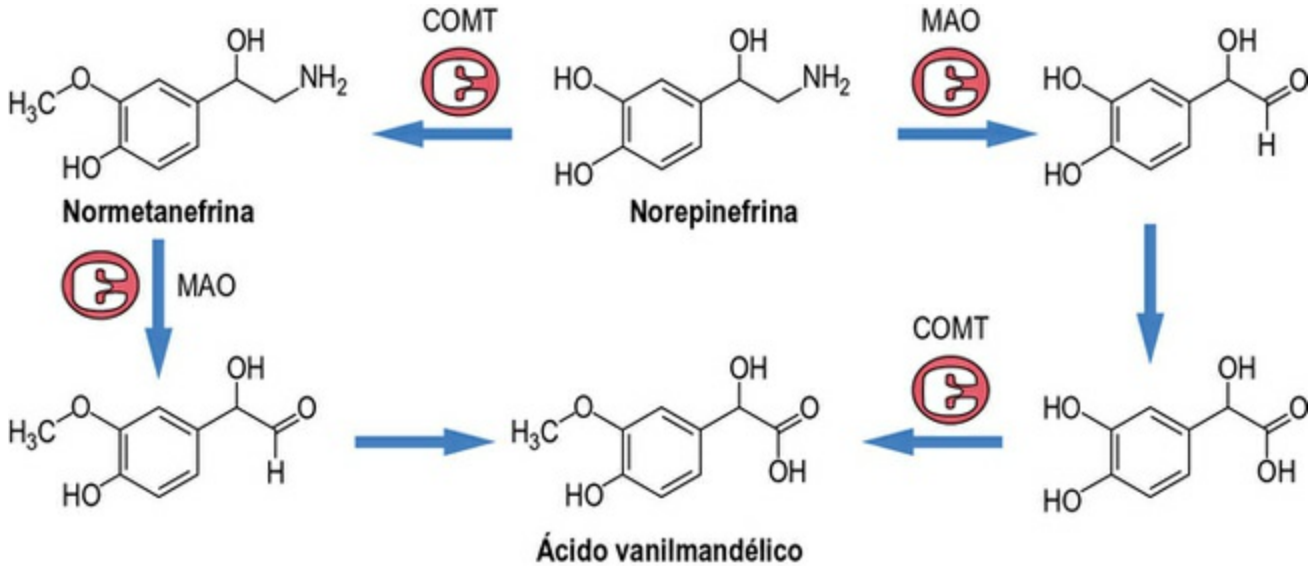


FIG. 41.1.9 Catabolismo das catecolaminas.
As catecolaminas são degradadas por oxidação do grupo amino pela enzima monoamina oxidase (MAO) e por metilação pela catecol-*O*-metiltransferase (COMT). A via apresentada é referente à norepinefrina, mas as vias para epinefrina, dopamina e 5-HT são análogas.

Quadro de conceitos avançados

Depressão como uma doença dos neurotransmissores amina: os antidepressivos

Os **inibidores da monoamina oxidase (IMAO)** previnem o catabolismo das catecolaminas e da serotonina, portanto aumentam as concentrações desses compostos na sinapse e a ação dos transmissores. Os compostos com essa propriedade são os **antidepressivos**. A reserpina, um fármaco anti-hipertensivo que depleta as catecolaminas, causa depressão e não é mais utilizada. Assim, esses achados deram origem à "teoria aminérgica da depressão", que estabelece que a depressão é causada por uma deficiência relativa de aminas neurotransmissoras nas sinapses centrais e preconiza que os fármacos que aumentam as concentrações das aminas podem melhorar os sintomas dessa doença.

Corroborando essa teoria temos os antidepressivos tricíclicos, que inibem o transporte tanto de norepinefrina quanto de serotonina para o interior dos neurônios, aumentando assim a concentração de aminas na fenda sináptica. Os **inibidores específicos da recaptação de serotonina (SSRI)**, como a fluoxetina (Prozac®), também são **antidepressivos** muito eficazes. Entretanto, como os sintomas da depressão melhoram somente alguns dias após o início do tratamento, acredita-se que

adaptações a longo prazo das concentrações dos transmissores e de seus receptores sejam pelo menos tão importantes quanto as alterações agudas nas concentrações das aminas na fenda sináptica.

Esse papel das monoaminas na depressão é, sem dúvida, uma supersimplificação. Como exemplo dessa simplificação citamos a cocaína, que também é um inibidor eficaz da recaptação, porém não tem ação antidepressiva, e as anfetaminas, que tanto bloqueiam a recaptação quanto estimulam a secreção das catecolaminas dos terminais nervosos, causando mania em vez de melhorar a depressão.

Dopamina

A dopamina é tanto um intermediário na síntese de norepinefrina quanto um neurotransmissor

É um importante neurotransmissor em nervos que interconectam os núcleos dos gânglios basais no cérebro e o controle do movimento voluntário (Fig. 41.1.10). Os danos nesses nervos causam a doença de Parkinson, a qual é caracterizada por tremor e dificuldade no início e no controle dos movimentos. A dopamina também é encontrada em vias que afetam o sistema límbico do encéfalo, que está envolvido nas respostas emocionais e na memória. Alterações no sistema dopaminérgico estão envolvidas na **esquizofrenia**, uma vez que muitos fármacos antipsicóticos utilizados no tratamento dessa doença ligam-se aos receptores de dopamina.

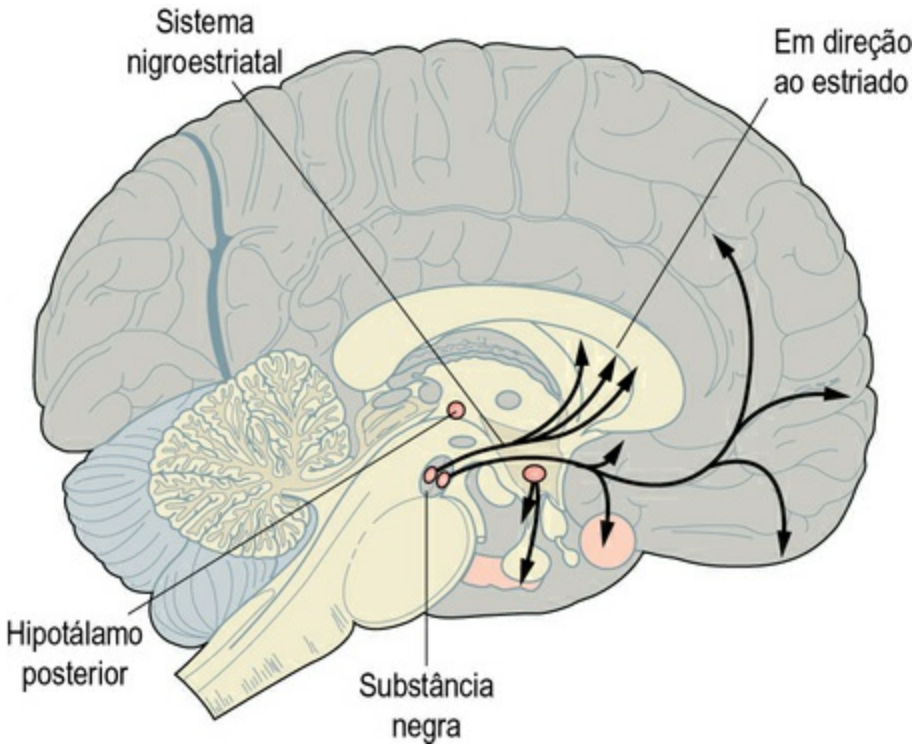


FIG. 41.1.10 Dopamina no trato nigroestriatal.
Os nervos contendo dopamina correm em tratos bem definidos. Um dos tratos mais importantes é o nigroestriatal, que conecta a substância negra no mesencéfalo aos núcleos basais abaixo do córtex. Dano nessa via causa a doença de Parkinson, com perda do controle fino dos movimentos.

Quadro clínico

Mulher de 56 anos apresenta hipertensão grave: feocromocitoma

Uma mulher de 56 anos apresenta hipertensão grave, com crises de sudorese, cefaleia e palpitações. Sua hipertensão não respondeu ao tratamento com inibidor da enzima conversora de angiotensina e diurético. Foi feita coleta de uma amostra de urina para a quantificação de catecolaminas e metabólitos. A taxa de excreção de norepinefrina foi de 1.500 nmol/24 h (253 mg/24 h) (valor de referência < 900 nmol/24 h, < 152 mg/24 h), a de epinefrina foi de 620 nmol/24 h (113 mg/24 h) (valor de referência < 230 nmol/24 h, < 42 mg/24 h) e a do ácido vanilmandélico foi de 60 mmol/24 h (11,9 mg/24 h) (valor de referência < 35,5 mmol/24 h, [< 7 mg/24 h]) (Figura 41.1.9).

Comentário

A paciente tem um feocromocitoma, que é um tumor da medula adrenal que secreta catecolaminas. Tanto a norepinefrina quanto a epinefrina podem ser secretadas: a norepinefrina causa hipertensão pela ativação dos adrenoceptores do tipo α_1 no músculo liso vascular, e a epinefrina aumenta a frequência cardíaca pela ativação dos adrenoceptores do tipo β_1 no músculo cardíaco. A hipertensão pode ser paroxística e grave, levando a acidente vascular ou parada cardíaca.

O diagnóstico é feito quantificando-se as catecolaminas no plasma ou na urina, ou de seus metabólitos, como as metanefrinas e o ácido vanilmandélico, na urina. O tumor geralmente pode ser localizado por meio de técnicas radiológicas, como a ressonância magnética nuclear (RMN) ou por tomografia computadorizada (TC).

Apesar de ser uma causa rara de hipertensão, correspondendo a somente 1% dos casos, é muito importante que ela seja lembrada, uma vez que é uma condição perigosa e frequentemente responde ao tratamento cirúrgico.

Quadro clínico

Deficiências da tirosina hidroxilase e do aminoácido aromático descarboxilase (AADC): causas hereditárias de prejuízo do metabolismo de aminas biogênicas

A tirosina hidroxilase é o primeiro passo da biossíntese da dopamina, e os distúrbios hereditários que afetam a atividade dessa enzima levam à deficiência de dopamina no encéfalo. Diversos fenótipos clínicos foram descritos, incluindo um distúrbio de marcha progressivo e parkinsonismo infantil. O tratamento da deficiência da tirosina hidroxilase é feito pela administração de l-dopa. Com o objetivo de prevenir a descarboxilação da l-dopa em dopamina no sangue (pelo aminoácido aromático descarboxilase periférica [AADC]), um inibidor (que não afeta a atividade da enzima

AADC encefálica) é administrado junto com a l-dopa. Essa inibição otimiza o transporte de l-dopa através da barreira hematoencefálica. No interior do encéfalo, a AADC pode então converter a l-dopa em dopamina.

A AADC catalisa a conversão da l-dopa em dopamina e do 5-hidroxitriptofano em serotonina. Consequentemente, um erro inato do metabolismo afetando a atividade dessa enzima resulta em uma deficiência encefálica tanto de dopamina quanto de serotonina. Os pacientes com deficiência de AADC têm um quadro clínico que inclui grave distúrbio do movimento, movimentos oculares anormais e prejuízo neurológico. O tratamento da deficiência da AADC consiste na prevenção da degradação de qualquer dopamina e serotonina que possa ser produzida pela atividade residual da AADC, isto é, pelo uso dos inibidores da monoamina oxidase. Além disso, os agonistas da dopamina, como a pergolida e a bromocriptina, são utilizados para "mimetizar" os efeitos da dopamina.

Na periferia, a dopamina causa vasodilatação e é, portanto, utilizada clinicamente para estimular o fluxo sanguíneo renal, sendo importante no tratamento da **falência renal** (Cap. 23). O catabolismo da dopamina é comparável ao da norepinefrina, entretanto o principal metabólito formado é o ácido homovanílico (HVA).



Quadro clínico

A perda de atividade de um transportador de dopamina leva a um quadro clínico sugestivo de um estado de deficiência de dopamina

A dopamina liberada na fenda sináptica é recaptada, por meio do transportador de dopamina (DAT; SLC6A3), para os neurônios pré-sinápticos, onde pode ser reciclada. Encontram-se agora documentadas mutações autossômicas recessivas que afetam o DAT. Isso resulta em deficiência de dopamina neuronal intracelular e aumento marcante dos níveis extracelulares do neurotransmissor. **Esta dopamina em excesso é metabolizada em ácido homovanílico (HVA)** por intermédio da monoamina oxidase não neuronal e da catecol-*O*-metiltransferase. Uma concentração acentuadamente elevada de HVA no líquido cefalorraquidiano (LCR) é um forte indicador de deficiência de DAT. A prolactina sérica pode igualmente se encontrar elevada nesse distúrbio. Clinicamente, os pacientes com mutações DAT podem apresentar distonia-parkinsonismo associada a um distúrbio do movimento ocular e características de trato piramidal. Atualmente não existe um tratamento adequado.



Quadro de teste clínico

A concentração hormonal sérica pode apontar para a deficiência central de neurotransmissores: prolactina e dopamina

A dopamina hipotalâmica é um inibidor da liberação de prolactina da pituitária. Consequentemente, uma deficiência profunda de dopamina central pode levar a elevações na concentração sérica de prolactina. No entanto, a adoção de intervalos de referência ajustados à idade é crítica para o uso deste biomarcador periférico porque, por exemplo, a concentração sérica de prolactina declina pronunciadamente durante o primeiro ano de vida. Embora a prolactina sérica possa não estar elevada em todos os casos de deficiência central de dopamina, foram documentadas elevações nos distúrbios hereditários do metabolismo da tetra-hidrobiopterina e nos estados de deficiência de tirosina hidroxilase e da descarboxilase de aminoácidos aromáticos. Além disso, a correção do déficit central de dopamina pode ser acompanhada de uma diminuição da concentração sérica de prolactina, possibilitando desse modo a monitorização da eficácia do tratamento.

Serotonina (5-hidroxitriptamina)

A serotonina, também chamada de 5-hidroxitriptamina (5-HT), é derivada do triptofano (Fig. 41.1.7)

Além disso, a biossíntese de serotonina tem várias semelhanças bioquímicas com a síntese da dopamina. Dessa forma, a triptofano hidroxilase, assim como a tirosina hidroxilase, têm necessidade do cofator tetra-hidrobiopterina (BH_4) (ver a seguir). Além disso, o 5-hidroxitriptofano é convertido em serotonina pela dopa descarboxilase (também conhecida como aminoácido aromático descarboxilase).

Os neurônios serotoninérgicos concentram-se nos núcleos da rafe, no tronco encefálico superior (Fig. 41.1.11), porém se projetam para cima, em direção ao córtex cerebral, e para baixo, para a medula espinhal. Esses neurônios são mais ativos quando os indivíduos estão acordados do que quando estão dormindo, e a serotonina pode controlar o grau de responsividade dos neurônios motores na medula espinhal. Além disso, a serotonina também está envolvida nos chamados comportamentos vegetativos, como alimentação, comportamento sexual e controle da temperatura.

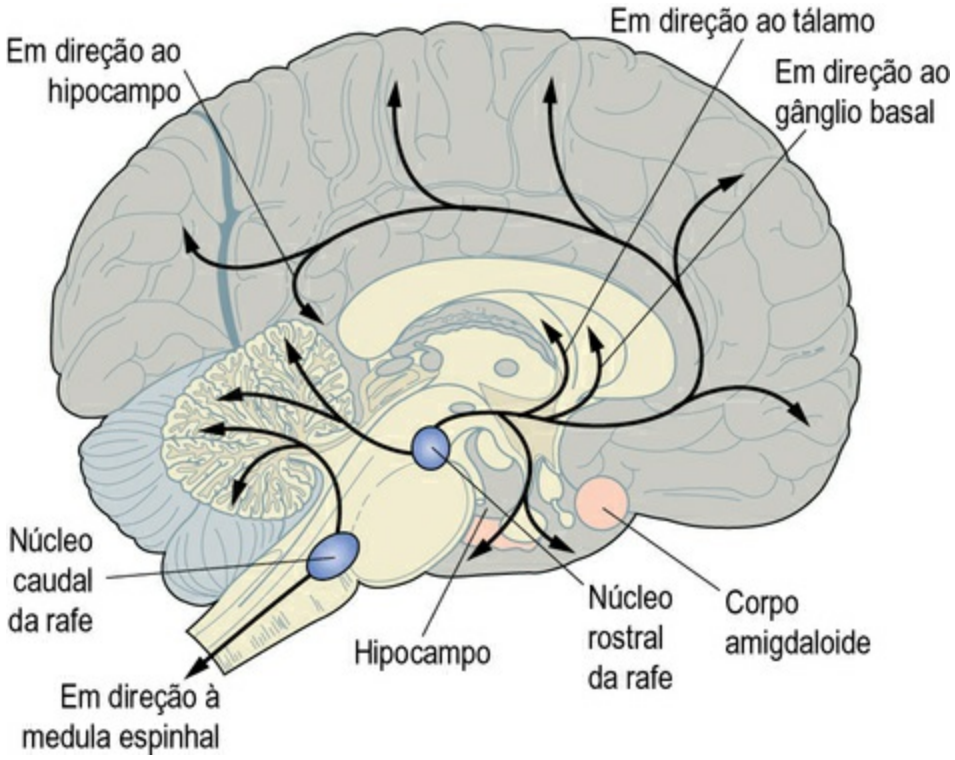


FIG. 41.1.11 Nervos serotoninérgicos no SNC.
Os nervos que contêm serotonina se originam no núcleo da rafe, parte da formação reticular do tronco encefálico superior. Assim como os nervos que contêm norepinefrina, eles são amplamente distribuídos.

Acetilcolina

A acetilcolina (ACh) é o transmissor do sistema nervoso autônomo parassimpático e dos gânglios simpáticos (Fig. 41.3)

A estimulação do sistema parassimpático produz geralmente efeitos opostos aos do sistema simpático, como redução da frequência cardíaca, broncoconstrição e estimulação da musculatura lisa do intestino. A ACh também atua na junção neuromuscular, na qual os nervos motores fazem contato com as células da musculatura esquelética e causam sua contração. Além dessas funções, a ACh pode estar envolvida nos processos de aprendizado e de memória, uma vez que os neurônios contendo esse transmissor também estão presentes no encéfalo.

A ACh é sintetizada a partir da colina pela enzima colina acetiltransferase. Após ser secretada na fenda sináptica, a ACh é amplamente quebrada pela acetilcolinesterase. O restante é captado pela célula nervosa por transportadores semelhantes aos das aminas.

Existem duas classes principais de receptores de ACh: os **nicotínicos** e os **muscarínicos** (Cap. 41.2; Fig. 41.2.3).

Quadro de conceitos avançados

Receptores de dopamina e serotonina

Foram isolados múltiplos receptores para dopamina e serotonina. Nem todos os

receptores clonados têm atividade funcional, porém a possível relevância em termos de desenvolvimento de fármacos é óbvia. Em alguns casos, a manipulação específica de determinados receptores pode ser explorada terapeuticamente.

Existem cinco receptores de dopamina conhecidos, pertencentes a dois principais grupos (do **tipo D_1:** D_1 e D_5, e do **tipo D_2:** D_2, D_3 e D_4), que diferem em suas vias de sinalização. Os receptores D_1 aumentam a produção de cAMP, enquanto os receptores D_2 a inibem. Os fármacos antipsicóticos, como as fenotiazinas e o haloperidol, tendem a inibir os receptores do tipo D_2, sugerindo que o excesso da atividade dopaminérgica pode ser importante na gênese dos sintomas da esquizofrenia.

O receptor D_2 é o principal receptor nos nervos que interconectam os gânglios basais. Uma vez que se sabe que a destruição desses nervos causa a **doença de Parkinson**, não é de surpreender que os fármacos antipsicóticos que inibem os receptores D_2 tendam a possuir efeitos adversos que causam movimentos anormais. Fármacos como a clozapina, que se ligam preferencialmente ao receptor D_4, parecem ser livres desses efeitos adversos, apesar de esse fármaco, em particular, também se ligar a diversos outros receptores.

Mais de uma dúzia de **receptores de serotonina (5-HT)** foi isolada utilizando-se técnicas de biologia molecular. Eles foram divididos em classes e subclasses com base nas suas propriedades farmacológicas e estruturais. A maior parte deles é metabotrópica, apesar de o receptor 5-HT_3 ser ionotrópico e mediar um sinal rápido no sistema nervoso entérico. O receptor 5-HT_{1A} é encontrado em diversos neurônios pré-sinápticos, nos quais ele atua como um autorreceptor inibindo a liberação de 5-HT.

Em geral, o aumento da concentração encefálica de 5-HT parece aumentar a **ansiedade**, enquanto sua redução é útil no tratamento dessa condição. O antidepressivo buspirona atua como um agonista de receptores 5-HT_{1A} e, presumivelmente, causa diminuição na produção de 5-HT. Além de seus efeitos no receptor D_4 de dopamina, a clozapina se liga fortemente ao receptor 5-HT_{2A} e é possível que um alto grau de antagonismo do receptor 5-HT_{2A}, aliado a uma baixa atividade de ligação em D_2, seja desejável para que fármacos utilizados no tratamento da esquizofrenia apresentem o mínimo de efeitos adversos. O ondansentrona, um bloqueador de receptor 5-HT_3, é um antiemético muito utilizado na prevenção de vômitos durante a quimioterapia. A enxaqueca pode ser tratada com sumatriptano, um agonista 5-HT_{1D}.

O papel central da 5HT no controle da função encefálica e o grande número de receptores associados sugerem a possibilidade de se produzir grande número de fármacos para o tratamento de desordens específicas; entretanto, a manipulação farmacológica da função do sistema nervoso ainda está dando seus primeiros passos.



Quadro clínico

Homem de 60 anos com crises de ruborização e diarreia: síndrome carcinoide

Um homem de 60 anos queixa-se de ruborização associada a aumento da frequência cardíaca. Ele também apresenta diarreia e dor abdominal, além de relatar perda de peso. Os sintomas sugeriram o diagnóstico de síndrome carcinoide causada pelo excesso de secreção de serotonina ou de outros compostos metabolicamente ativos por um tumor. Para confirmar esse quadro foi coletada uma amostra de urina para a determinação de ácido **5-hidroxi-indolacético (5-HIAA)**, o principal metabólito de 5-HT. A concentração encontrada foi de 120 mmol/24 h (23 mg/24 h) (valor de referência 10-52 mmol/24 h, 3-14 mg/24 h).

Comentário

O paciente apresentava uma síndrome carcinoide causada por tumores de células enterocromafins, geralmente originárias do íleo e que se metastatizaram para o fígado. Essas células estão relacionadas com as células cromafins produtoras de catecolaminas na medula adrenal e convertem o triptofano em serotonina (5-HT). Acredita-se que a serotonina propriamente dita cause diarreia, porém outros mediadores, como a histamina e a bradicinina, podem ser mais importantes nas crises de ruborização. A concentração urinária de 5-HIAA fornece um teste diagnóstico útil e pode ser utilizada para monitorar a resposta ao tratamento do câncer.

Ambos respondem à ACh, porém podem ser distinguidos por meio de seus agonistas e antagonistas, uma vez que são estruturalmente bem distintos e diferem em relação aos seus mecanismos de ação.

- **Os receptores nicotínicos são ionotrópicos.** Esses receptores se ligam à nicotina e são encontrados nos gânglios e na junção neuromuscular. Quando a ACh ou a nicotina se liga a esse receptor, um canal se abre, permitindo a passagem tanto de Na^+ quanto de K^+. Por ser direta, a ação do ligante no canal é rápida.
- **Os receptores muscarínicos, que respondem à toxina fúngica muscarina, são metabotrópicos.** Esses receptores são bem mais disseminados no encéfalo do que os receptores nicotínicos, e são também os principais receptores encontrados no músculo liso e nas glândulas, que recebem inervação dos nervos parassimpáticos. A **atropina** inibe especificamente esses receptores. Existem vários receptores muscarínicos independentes, que diferem em relação à sua distribuição tecidual e vias de sinalização. Até o momento não se tem claro um padrão a respeito de suas funções específicas.

Clinicamente, os agonistas de ACh, junto com os anticolinesterásicos, são utilizados no tratamento do **glaucoma**, uma doença ocular caracterizada pela elevação da pressão intraocular e causada pelo aumento do tônus dos músculos de acomodação do olho, e para estimular a função intestinal após procedimento cirúrgico. Por outro lado, quando a acetilcolinesterase é inibida pelos **inseticidas organofosfatados** ou pelos **gases que afetam o sistema nervoso**, ocorre uma síndrome tóxica causada pelo excesso de acetilcolina. Podem ocorrer diarreia, aumento da atividade secretora de diversas

glândulas e broncoconstrição. Essa síndrome pode ser antagonizada pela atropina, apesar de o tratamento a longo prazo envolver o uso de fármacos, como a pralidoxima, que é capaz de remover o inseticida da enzima.



Quadro clínico

Mulher com visão dupla ocasional e alteração de voz: miastenia grave

Uma mulher de 35 anos observou dificuldade em manter os olhos abertos. Ela também apresentava períodos de visão dupla quando sua voz se apresentava alterada e anasalada, além de dificuldade de deglutição. Seu médico suspeitou de miastenia, uma doença de condução nervo-músculo. O título sérico de anticorpos **contra receptores de acetilcolina** apresentava-se elevado.

Comentário

A paciente era portadora de miastenia grave, doença que se manifesta como fraqueza dos músculos voluntários e é corrigida pelo tratamento com inibidores da acetilcolinesterase. Essa doença é causada pela produção de autoanticorpos direcionados contra o receptor nicotínico de acetilcolina, os quais são circulantes no soro. Por causa desses autoanticorpos, a transmissão dos impulsos nervosos para o músculo está muito menos eficiente do que o normal.

Os fármacos que inibem a acetilcolinesterase aumentam a concentração de acetilcolina na fenda sináptica, o que compensa o reduzido número de receptores. A melhora na condução nervo-músculo em resposta ao edrofônio pode ser utilizada como um teste diagnóstico, porém necessita de diversas precauções, e o uso de inibidores da acetilcolinesterase de longa duração, como a piridostigmina, pode ser feito no tratamento da doença, porém os corticosteroides são frequentemente eficazes.

Óxido nítrico

O óxido nítrico é produzido a partir da arginina pelas óxido nítrico sintases dependentes de tetra-hidrobiopterina nos nervos autônomos e entéricos

O NO possui inúmeras funções fisiológicas, incluindo o relaxamento da musculatura lisa, tanto vascular quanto intestinal, e a possível regulação da produção energética mitocondrial. Além disso, no interior do encéfalo, o NO pode estar envolvido na formação da memória; entretanto, a formação excessiva de NO tem sido implicada nos processos neurodegenerativos associados às doenças de **Parkinson** e de **Alzheimer**. Enquanto o mecanismo exato pelo qual o excesso do NO causa morte neuronal permanece desconhecido, existem fortes evidências sugerindo que o dano irreversível da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial pode ser um fator importante.

O NO não é armazenado em vesículas, mas liberado diretamente no espaço

extracelular

Consequentemente, o NO não preenche todos os critérios atuais para ser rotulado como um neurotransmissor. O NO por si só se difunde facilmente entre as células e se liga diretamente aos grupamentos heme na enzima guanilil ciclase, estimulando a produção do monofosfato de guanosina cíclica.

Outras moléculas pequenas

Atualmente sabe-se que o ATP e outras purinas derivadas dele têm funções transmissoras

O ATP está presente nas vesículas sinápticas dos nervos simpáticos, junto com a norepinefrina, e é responsável pelos potenciais excitatórios rápidos no músculo liso. Os receptores de adenosina estão disseminados no encéfalo e no tecido vascular. A adenosina tem função amplamente inibitória no SNC e acredita-se que a inibição de receptores de adenosina no SNC seja o mecanismo subjacente aos efeitos estimulatórios da **cafeína**.

O estudo da histamina em nervos é complicado em função da grande quantidade presente nos mastócitos

A histamina é encontrada em pequeno número de neurônios, principalmente no hipotálamo, apesar de suas projeções serem disseminadas por todo o encéfalo. Foi demonstrado que a histamina controla a liberação dos hormônios da pituitária, o alerta e a ingestão de alimentos. Os **anti-histamínicos** utilizados para controlar as **alergias** causadas pela liberação de histamina pelos mastócitos atuam em receptores do tipo H_1 e tendem a ser sedativos, sugerindo que outras funções centrais provavelmente também existam. O **receptor de histamina no estômago** é da classe H_2; assim, os inibidores dos receptores do tipo H_2, como a **cimetidina** e a **ranitidina**, que são utilizados no tratamento da úlcera péptica, não exercem efeitos no tratamento da alergia.



Quadro clínico

Deficiência de fosfato de piridoxal: uma causa da epilepsia neonatal

O fosfato de piridoxal (PLP), a forma biologicamente ativa da vitamina B_6 (Cap. 11), é utilizado como cofator por mais de 100 enzimas, incluindo as reações catalisadas pelo aminoácido aromático descarboxilase (AADC), pela treonina desidratase e pelo sistema de clivagem de glicina. A vitamina B_6 está presente no organismo humano como diversos vitâmeros que são precursores do PLP. Uma enzima importante na formação do PLP é a piridox(am)ina-5'-fosfato oxidase (PNPO). Essa enzima catalisa a conversão dos precursores do fosfato de piridoxina e fosfato de piridoxamina em PLP. A deficiência de PNPO leva à diminuição da biodisponibilidade de PLP, e tais

pacientes, quando no período neonatal, desenvolvem quadro clínico que inclui epilepsia grave. A análise bioquímica do LCR revela aumento de treonina e de glicina, além de evidências de prejuízo da atividade da AADC. Além disso, a concentração de PLP no LCR está diminuída. O tratamento, que pode ser particularmente eficaz, é realizado por meio da administração de PLP.

Peptídios

Muitos peptídios atuam como neurotransmissores

Ainda é uma questão em aberto se todos os peptídios descritos são neurotransmissores verdadeiros, contudo foi demonstrado que mais de 50 pequenos peptídios influenciam a função neural. Todos os receptores de peptídios conhecidos são metabotrópicos e acoplados à proteína G (Cap. 40) e, portanto, são de ação relativamente lenta. Não há vias de captação ou enzimas de degradação específicos, e a principal via de eliminação é a difusão simples seguida de clivagem por inúmeras peptidases no líquido extracelular. Isso permite que um peptídio afete inúmeros neurônios antes que ele seja finalmente degradado.

O **peptídio intestinal vasoativo** (VIP) é um dos muitos peptídios que afetam a função do intestino por meio do sistema nervoso entérico. Esse peptídio foi originalmente descrito como um hormônio intestinal que afetava o fluxo sanguíneo e a secreção de líquidos, porém atualmente sabe-se que se trata de um neuropeptídio entérico importante que inibe a contração da musculatura lisa e causa vasodilatação em diversas glândulas secretoras, além de potencializar a estimulação pela ACh.

Diversos neuropeptídios pertencem a uma família multigênica

Os **peptídios opioides** e receptores opioides são um bom exemplo de uma família multigênica. Eles são os ligantes endógenos para os analgésicos opioides, como a morfina e a codeína. O controle da dor é complexo e os peptídios opioides e seus receptores são encontrados tanto na medula espinhal quanto no encéfalo propriamente dito. Existem, no mínimo, três genes que codificam esses peptídios, e cada um contém as sequências para diversas moléculas ativas:

- **a pró-opiomelanocortina** contém a β-endorfina que se liga aos receptores opioides do tipo μ e também o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e os hormônios estimulantes dos melanócitos (MSH), os quais são hormônios da pituitária (Cap. 39);
- **a pró-encefalina A** contém as sequências para as Met- e Leu-encefalinas, que se ligam aos receptores do tipo δ e estão envolvidas na regulação da dor localmente no encéfalo e na medula espinhal;
- **a pró-dinorfina** contém as sequências para a dinorfina e diversos outros peptídios, que se ligam aos receptores da classe κ.

Os opioides afetam as vias de sinalização do prazer no encéfalo, o que explica seus efeitos de euforia, e também têm efeitos adversos, como depressão respiratória, o que restringe o seu uso. Em excesso, causam a contração dos músculos dos olhos, resultando

em "pupilas de alfinete". Foi demonstrado que as **endorfinas** são secretadas após exercício extenuante, causando o tão conhecido ***jogger's high***. Espera-se que mais informações sobre os receptores e as vias neurais dos opioides permitam o desenvolvimento de analgésico com menos efeitos adversos e menor probabilidade de abuso.

A substância P, outro membro da família multigênica, conhecida como família da taquicinina, está presente nas fibras aferentes dos nervos sensoriais, transmite sinais em resposta à dor e está envolvida na inflamação neurogênica estimulada por impulsos nervosos, sendo um importante neurotransmissor no intestino.

Os neuropeptídios podem atuar como neuromoduladores

Alguns peptídios atuam como verdadeiros neurotransmissores, porém eles também têm muitos outros tipos de ações. Frequentemente alteram a ação de outros transmissores, atuando como neuromoduladores, porém não possuindo uma ação por si só. Por exemplo, o VIP aumenta o efeito da ACh na secreção da glândula salivar nas glândulas submandibulares de gatos (glândulas localizadas sob o osso maxilar) por causar vasodilatação e potencialização do componente colinérgico. O NPY inibe a secreção de norepinefrina nos terminais nervosos autônomos, que atuam nos autorreceptores pré-sinápticos e potencializam a ação da norepinefrina em determinadas artérias, enquanto suas próprias ações são fracas. Os peptídios opioides também são capazes de modular a secreção de neurotransmissor.

Resumo

- Os neurônios se comunicam nas sinapses por meio de neurotransmissores.
- Grande número de compostos de baixo peso molecular, como as aminas biogênicas ou peptídios maiores, pode atuar como neurotransmissores.
- Eles atuam em receptores específicos e, normalmente, existe mais de um receptor para cada neurotransmissor.
- A presença de diversos transmissores nos mesmos nervos e a identificação de múltiplos receptores sugerem a existência de alto grau de flexibilidade e de complexidade nos sinais que podem ser produzidos no sistema nervoso.

Questões para aprendizagem

1. O óxido nítrico preenche todos os critérios para ser definido como um neurotransmissor verdadeiro?
2. Explique como um neurotransmissor, como a serotonina, pode apresentar efeitos tão diversos no sistema nervoso central.
3. Explique como os neurotransmissores podem ser excitatórios ou inibitórios.
4. Quais são os tipos de neurotransmissores que podem estar reduzidos no encéfalo de um paciente com erro inato afetando a tirosina hidroxilase, o aminoácido aromático descarboxilase e o metabolismo da tetra-hidrobiopterina?
5. Discuta os fatores que precisam ser considerados ao se estabelecer um método

diagnóstico para distúrbios do metabolismo de dopamina e de serotonina.
6. Explique o conceito de receptores ionotrópicos e metabotrópicos.

Leituras sugeridas

Aitkenhead, H., Heales, S. J. Establishment of paediatric age-related reference intervals for serum prolactin to aid in the diagnosis of neurometabolic conditions affecting dopamine metabolism. *Ann Clin Biochem*. 2013; 50:156–158.

Clayton, P. T. B6-responsive disorders: a model of vitamin dependency. *J Inherit Metab Dis*. 2006; 29:317–326.

Hyland, K. Inherited disorders affecting dopamine and serotonin: critical neurotransmitters derived from aromatic amino acids. *J Nutr*. 2007; 137(6 suppl 1):1568S–1572S.

Kurian, M. A., Zhen, J., Meyer, E., et al. Clinical and molecular characterisation of hereditary dopamine transporter deficiency syndrome: an observational cohort and experimental study. *Lancet Neurol*. 2011; 10:54–62.

Lam, A. A.J., Hyland, K., Heales, S. J.R. Tetrahydrobiopterin availability, nitric oxide metabolism and glutathione status in the hph-1 mouse: implications for the pathogenesis and treatment of tetrahydrobiopterin deficiency states. *J Inherit Metab Dis*. 2007; 30:256–262.

Sites

The AADC Research Trust: www.aadcresearch.org.

Databases of PKU and PND variations this website hosts databases of pediatric neurotransmitter disorders (PND): www.BioPKU.org

The PND Association is a disease organization representing children and families who are affected by a pediatric neurotransmitter disease: www.pndassoc.org

CAPÍTULO 41.2

Neuroquímica

Hanna Bielarczyk, Andrzej Szutowicz and Edward J. Thompson

Objetivos

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever os componentes celulares do sistema nervoso central.
- Discutir a função da barreira hematoencefálica na saúde e na doença.
- Descrever os princípios básicos da sinalização neuronal e de seus receptores.
- Descrever as transmissões catecolaminérgica, colinérgica, glutamatérgica e GABAérgica.
- Descrever a função dos canais iônicos na transmissão nervosa.
- Comentar a função dos íons sódio, potássio e cálcio na transmissão nervosa.
- Discutir o processo de visão como exemplo de processo químico subjacente à função neuronal.

Introdução

O encéfalo é, de muitas formas, um deleite para os químicos porque ele ilustra diversos princípios gerais da biologia aplicados a um tecido altamente especializado, que, por fim regula todos os outros tecidos do organismo. Este capítulo destaca as diferenças entre o sistema nervoso central – que é constituído pelo cérebro e pela medula espinal – e o sistema nervoso periférico, que se encontra fora da dura-máter (a cobertura fibrosa e espessa que contém o líquido cerebroespinal [CSF]).

O encéfalo e os nervos periféricos

A distinção entre encéfalo e nervo periférico reflete, em essência, a divisão entre o sistema nervoso central (SNC) e o sistema nervoso periférico (SNP): de forma conveniente, os limites da dura-máter caracterizam a linha divisória, em cujo

compartimento impermeável encontra-se o CSF, parcialmente produzido (aproximadamente um terço do volume total) por meio da ação da barreira hematoencefálica. A mielina isola os axônios dos nervos; a composição química da mielina do SNC é bem diferente da mielina do SNP, uma vez que as duas formas são produzidas por dois tipos de células diferentes: os oligodendrócitos no SNC e as células de Schwann no SNP. A distinção entre as funções do SNC e aquelas do SNP é fundamental para o diagnóstico diferencial em neurologia. Um exemplo típico é a diferença entre a desmielinização que ocorre no SNC na esclerose múltipla e a desmielinização que ocorre no SNP na **síndrome de Guillain-Barré**.

A barreira hematoencefálica

O termo "barreira" hematoencefálica é ligeiramente errôneo, uma vez que a barreira não é absoluta, mas relativa: sua permeabilidade depende do tamanho da molécula em questão

Inicialmente, os experimentos baseados no uso de um corante (azul de Evans) ligado à albumina demonstraram que, em um período de horas, todos os tecidos de um animal tornavam-se progressivamente azuis, com a notável exceção do encéfalo, que permanecia branco. Subsequentemente, tornou-se claro que uma em 200 moléculas de albumina sérica passava normalmente para o CSF, que é considerado análogo à linfa. Também se tornou evidente que, para qualquer proteína dada, a razão de sua concentração no CSF e no soro segue uma função linear do raio molecular das moléculas em solução.

Existem seis fontes de CSF

Sob condições normais e patológicas, as proteínas passam dessas fontes celulares ou teciduais para o CSF, sendo que ocorre variação do grau de filtração ou da taxa de síntese local, ou ambas variam. A quantidade total de CSF constitui a soma algébrica dessas seis fontes (Fig. 41.2.1):

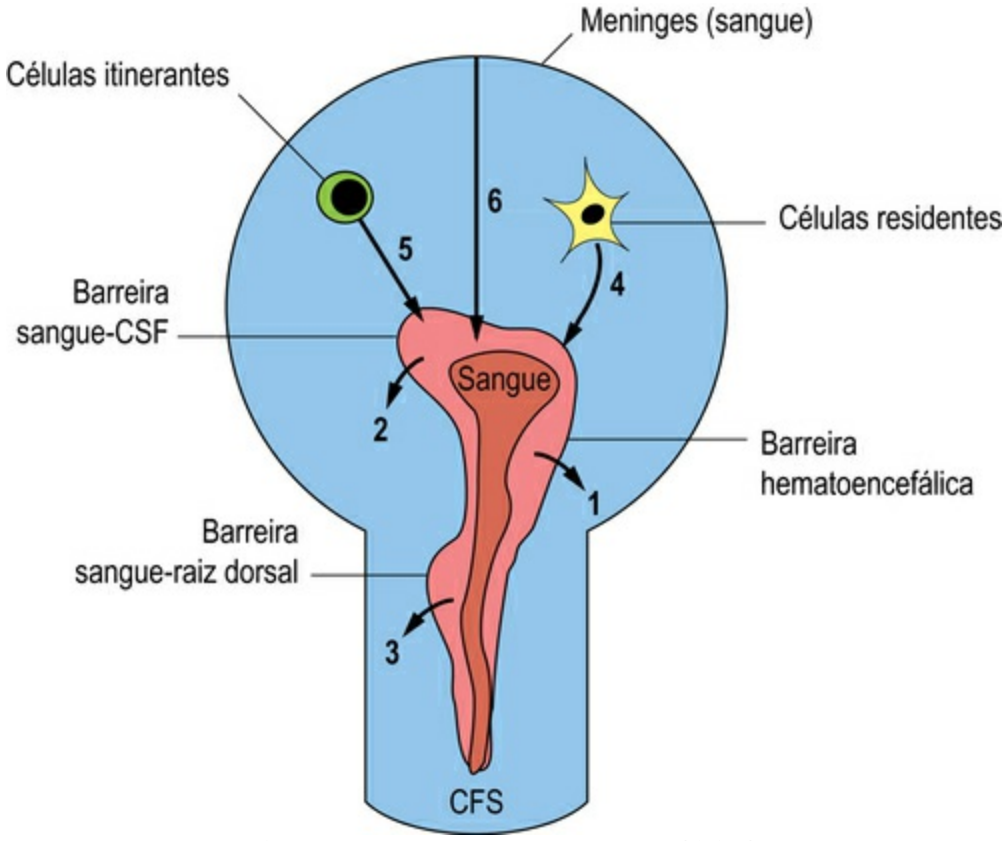


FIG. 41.2.1 As seis principais fontes de líquido cerebroespinal (CSF). Os processos envolvidos compreendem a passagem através de barreiras (do sangue, isto é, 1, 2, 3) e fontes diretas de produção local (células do SNC, isto é, 4, 5, 6).

- **A barreira hematoencefálica** (os capilares do parênquima) dá origem a aproximadamente um terço do volume do CSF, tendo sido denominada fonte do líquido intersticial.
- **A barreira sangue-CSF** fornece o volume do CSF (praticamente os dois terços remanescentes), denominado líquido coroidal, uma vez que ele é principalmente fornecido pelo plexo coroide (tufos capilares) localizado nos ventrículos laterais e, em menor grau, nos plexos localizados no terceiro e no quarto ventrículos.
- **Os gânglios da raiz dorsal** contêm capilares que possuem um grau muito maior de permeabilidade.
- **O parênquima encefálico do SNC** produz diversas proteínas encefálicas específicas, que incluem a prostaglandina sintase (anteriormente chamada de proteína β residual) e a transtirretina (uma proteína anteriormente chamada de pré-albumina).
- **Células circulantes do CSF**, principalmente os linfócitos dentro do SNC, sintetizam anticorpos locais, entretanto existe uma forte presença de células imunossupressoras no SNC. Devido a isso, no caso de infecções encefálicas, como a **meningite**, esteroides são administrados em associação aos antibióticos para suprimir os efeitos potencialmente devastadores, dentro desse espaço confinado, da inflamação associada à resposta imune intratecal.
- **As meninges** representam a sexta fonte de CSF sob condições patológicas e podem produzir aumentos drásticos nas concentrações das proteínas do CSF.

Quadro de conceitos avançados

Diagnóstico diferencial da descarga nasal (rinorreia)

Do ponto de vista clínico, é essencial fazer a distinção entre a rinorreia causada pelo CSF e as secreções nasais locais causadas, por exemplo, pela infecção por influenza. O cirurgião otorrinolaringologista deve saber se o líquido presente nessas secreções é proveniente do CFS, uma vez que qualquer extravazamento deve ser corrigido cirurgicamente, já que, do contrário, ele permanece como uma fonte potencialmente crônica de meningite, como resultado da migração da flora nasal para o espaço subaracnóideo. Uma proteína característica, que também é uma marcadora útil no CSF, é a **assialotransferrina**, uma transferrina que não possui ácido siálico. Na circulação sistêmica, essa ausência de ácido siálico fornece um sinal molecular para a reciclagem da proteína, que é imediatamente removida da circulação sistêmica por todas as células reticuloendoteliais. O encéfalo não possui células reticuloendoteliais verdadeiras ao longo da via do fluxo do CSF e, por isso, a assialotransferrina se encontra em concentrações bastante elevadas. O humor aquoso da câmara anterior do olho produz a assialotransferrina característica, a qual também pode ser encontrada na perilinfa dos canais semicirculares na orelha interna.

Quadro clínico

Homem de 65 anos com fraqueza progressiva dos membros: síndrome de guillain-barré

Três semanas após uma doença diarreica aguda, um homem de 65 anos apresentou fraqueza ascendente progressiva dos membros seguida de fraqueza dos músculos respiratórios, necessitando de ventilação assistida. No exame clínico, ele se apresentava hipotônico e arreflexo, com profunda fraqueza generalizada. A focalização isoelétrica do CSF e de amostras do soro realizadas em paralelo mostrou um padrão anormal de bandas oligoclonais em ambos.

Comentário

Essa neuropatia, predominantemente motora, é a síndrome de Guillain-Barré, e o paciente desenvolve anticorpos como resultado da infecção pela bactéria *Campylobacter jejuni*. O antígeno dessa bactéria é o açúcar gangliosídio GM1, o qual também é encontrado nos nervos periféricos. Assim, os anticorpos se ligam aos nervos motores periféricos e causam a neuropatia. Esse é um exemplo de **mimetismo molecular**.

Quadro clínico

Mulher de 75 anos com tontura, diarreia intermitente e dormência em ambos os pés: amiloidose

Uma mulher de 75 anos queixa-se de tontura postural, boca seca, diarreia intermitente e dormência em ambos os pés. No exame clínico foi observada importante redução da pressão sanguínea ao assumir a posição vertical. A radiografia de tórax revelou lesões líticas no esterno. Sua urina continha proteína de Bence-Jones. Um exame da medula óssea demonstrou aumento do número das células plasmáticas (Cap. 4).

Comentário

Sua condição neurológica foi causada pela amiloidose, na qual o componente livre da cadeia leve de globulina do mieloma produzido pelo tumor das células plasmáticas na medula óssea se acumula nos nervos periféricos. As cadeias leves adotam a configuração de folhas β-pregueadas, com múltiplas cópias que são intercaladas e resistentes à proteólise normal.

É essencial fazer o diagnóstico de uma doença que apresenta episódios de recidiva e de remissão, uma vez que o paciente pode não apresentar anormalidades no momento em que o médico realizar o exame físico. A punção lombar, portanto, tem um papel importante na demonstração de **bandas oligoclonais no CSF**, as quais estão ausentes na amostra de soro realizada em paralelo. Isso significa que ocorre uma resposta imunológica intratecal em vez de sistêmica. O oposto é observado no caso, por exemplo, da neurossarcoidose, em que as imunoglobulinas sintetizadas sistemicamente são transferidas passivamente para o CSF, originando um padrão chamado de "espelho", no qual as bandas oligoclonais são as mesmas, tanto no CSF quanto no soro. O exame envolve focalização isoelétrica do CSF com uma amostra de soro em paralelo. As imunoglobulinas separadas são expostas à anti-IgG para identificar as bandas que presentes no CSF, mas ausentes do soro correspondente. Esses padrões indicam a síntese local de IgG no encéfalo.

As células do sistema nervoso

Menos de 10% das células do sistema nervoso correspondem a neurônios grandes. Os três principais tipos de células do sistema nervoso (cada um corresponde a aproximadamente 30%) são **astrócitos**, que também fazem parte da barreira hematoencefálica; **oligodendrócitos**, que são principalmente compostos de gordura e atuam como isolantes dos axônios; e **microglia**, que é essencialmente formada por macrófagos residentes captores (*scavengers*).

Esses diferentes tipos de células estão associados às predominantes moléculas de proteínas que são importantes em diversas patologias encefálicas (Tabela 41.2.1). Outros constituintes secundários do sistema nervoso incluem as células ependimárias, que são células ciliadas secretoras de proteínas encefálicas específicas, como a prostaglandina sintase. As células endoteliais encefálicas, diferentemente de outros capilares teciduais, são unidas por junções oclusivas, e acredita-se que essa característica também contribua

para a barreira hematoencefálica, apesar de a membrana basal ser a principal fonte de peneiração molecular para as proteínas de tamanhos diferentes.

Tabela 41.2.1

As diferentes células do SNC e seus marcadores proteicos indicando patologias encefálicas

Célula	Proteína	Patologia
Neurônio	Enolase neurônio-específica	Morte encefálica
Astrócito	GFAP	Placa (ou escara)
Oligodendrócito	Proteína básica de mielina	De/remielinização
Microglia	Ferritina	Acidente vascular cerebral
Plexo coroide	Assialotransferrina	Extravasamento do CSF (rinorreia)

GFAP, proteína glial fibrilar ácida.

Neurônios

As características significativas dos neurônios são seu comprimento, suas muitas interconexões e o fato de eles não se dividirem após o nascimento

Existe uma noção arquetípica da atividade elétrica do sistema nervoso – em particular, da atividade elétrica dos neurônios. Entretanto, particularmente três outras características biológicas dos neurônios merecem destaque: seu comprimento, as interconexões prolíficas e o fato de eles não se dividirem após o nascimento.

Devido ao seu grande comprimento, os neurônios dependem de um sistema eficiente de transporte axonal

Os neurônios podem ser caracteristicamente de 1 m de comprimento; assim, o núcleo, a fonte de informação para a síntese de neurotransmissores, é em geral mais distante do terminal sináptico, o local de liberação desses transmissores. Por causa de sua longa extensão, uma necessidade crucial é a capacidade do neurônio de transportar material tanto do núcleo para a sinapse (transporte anterógrado) quanto da sinapse para o núcleo (transporte retrógrado). Os neurônios desenvolveram características especiais para lidar com a separação de seus dois sítios funcionais e a fim de manter a atividade elétrica nos nódulos de Ranvier (Fig. 41.2.2).

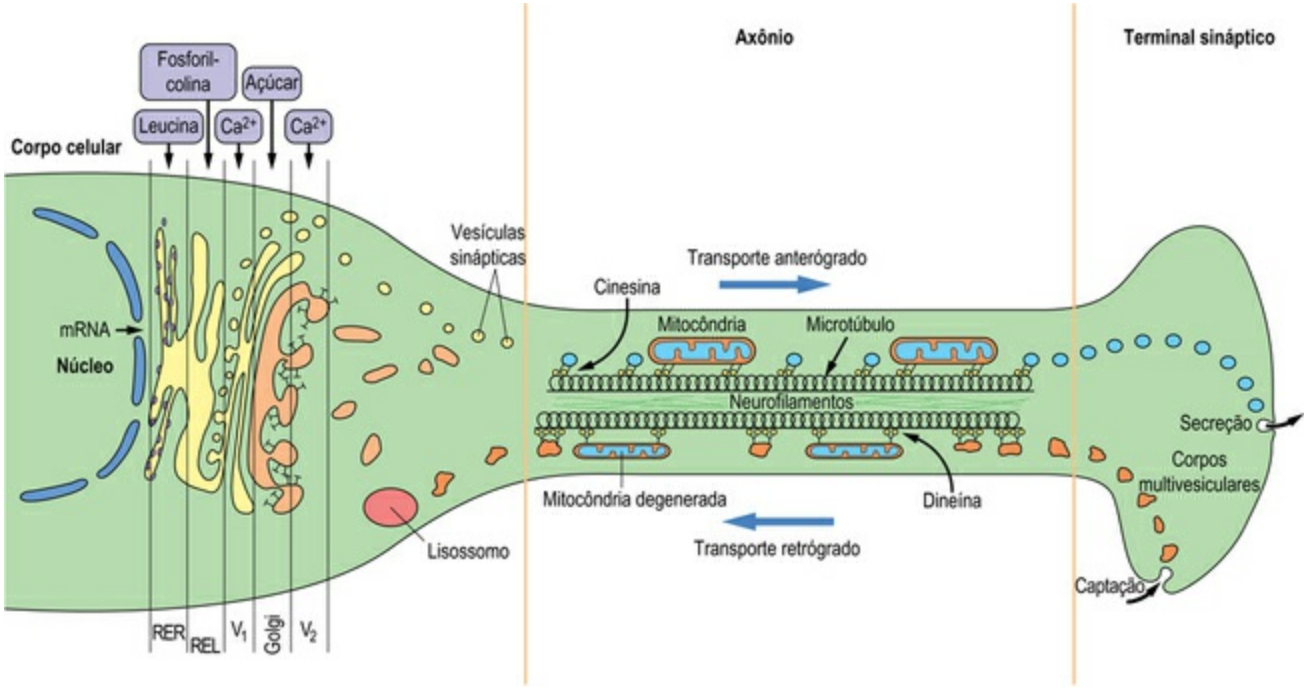


FIG. 41.2.2 Etrutura funcional de um neurônio.
Dentro do corpo celular, existem movimentos especializados que, através do complexo de Golgi, são realizados pelos componentes necessários para a formação das vesículas sinápticas (V_1, V_2). No axônio, ocorre transporte axonal rápido ao longo dos microtúbulos por meio das proteínas móveis cinesina (no transporte anterógrado) ou dineína (no transporte retrógrado). RER, retículo endoplasmático rugoso; REL, retículo endoplasmático liso.

O movimento normal de "repouso" dentro do axônio é mediado por **"motores" moleculares** independentes (proteínas móveis): a cinesina, no caso de transporte anterógrado, e a dineína, no transporte retrógrado. Os elementos que são transportados em cada direção também diferem bastante, e os diferentes componentes da estrutura axonal, apresentados na Figura 41.2.2, são os responsáveis pelas diferentes velocidades de transporte. Durante o crescimento, uma forma separada de transporte (em direção à sinapse) ocorre em uma velocidade de aproximadamente 1 mm/dia, sendo que esse fluxo constitui o movimento maciço dos blocos da estrutura, como as proteínas filamentosas.

A neurotransmissão é um processo que requer energia

Embora o cérebro constitua 2% da massa corporal, é responsável por 20% do consumo global de glicose em condições de repouso. A glicose é um substrato energético praticamente exclusivo para o cérebro. O cérebro não utiliza ácidos graxos para a produção de energia. Sob determinadas condições, ele poderá utilizar o β- -hidroxibutirato ou o lactato derivados da circulação. É necessária uma grande quantidade de energia para manter os potenciais de membrana de repouso dos neurônios, que estão sujeitos a contínuos (frequência de 10-60 Hz) ciclos de despolarização (potenciais de ação). Para suprir estas demandas, mais de 70% da energia cerebral são produzidos e utilizados pelos neurônios. Os astrócitos que utilizam glicose liberam quantidades significativas de lactato para o compartimento extracelular cerebral, e este serve como uma fonte de energia complementar para os neurônios. No entanto, nem o lactato exógeno nem o endógeno podem substituir completamente a glicose como principal fonte de energia.

Estruturas neurogliais

Os astrócitos e os oligodendrócitos compreendem as estruturas neurogliais

No córtex ou na substância cinzenta, caracteristicamente, encontram-se um astrócito protoplasmático com um conjunto de prolongamentos circundando as células endoteliais, que, assim, ajudam a "filtrar" as substâncias do sangue, e um conjunto separado de prolongamentos que circundam os neurônios, os quais são então "alimentados" com substâncias selecionadas que foram extraídas do sangue durante a passagem para os neurônios.

Na substância branca, os astrócitos apresentam um aspecto bem mais fibroso e desempenham uma função mais estrutural. Quando há lesão do SNC, os astrócitos podem ter um papel importante na reação, sintetizando grande quantidade da proteína glial fibrilar ácida (GFAP). Essa é o equivalente celular de uma cicatriz tecidual e é encontrada em doenças como a **esclerose múltipla**, na qual é o principal constituinte das placas características da doença. Os astrócitos não são encontrados no SNP.

Os oligodendrócitos presentes no SNC podem envolver em torno de 20 axônios, formando a bainha de mielina que isola esses prolongamentos neuronais uns dos outros e interrompe a comunicação cruzada entre os neurônios. Existe também intensa atividade mitocondrial dos oligodendrócitos nos nódulos de Ranvier, localizados paralelamente aos sítios de despolarização dentro do axônio subjacente. No SNP, as células de Schwann formam a mielina e possuem como característica o envolvimento de somente um único axônio.

Transmissão sináptica

Uma das características químicas exclusivas do encéfalo é a densidade extremamente elevada das sinapses entre os diferentes neurônios

Assim um neuro-hormônio de ação local é liberado por um único axônio para muitos outros corpos celulares. Na terminação receptora, um determinado corpo celular, em geral, recebe inúmeros produtos celulares por meio de sua árvore dendrítica abundantemente ramificada: cada ramo pode ser encoberto por **sinapses**. O "neurotransmissor" (neuro--hormônio) é liberado pelos terminais nervosos do axônio do primeiro neurônio na dendrite do segundo neurônio ou em uma célula não neuronal. Isso é mediado por um **receptor** de neurotransmissores na célula responsiva. Existe geralmente um **segundo mensageiro**, como um nucleotídio cíclico, que pode estimular a fosforilação proteica. Tipicamente, as **proteínas G** são encontradas mesmo abaixo da proteína receptora de neurotransmissores, que atravessa a membrana celular, onde elas atuam "acoplando" o primeiro mensageiro (p. ex., a norepinefrina) a um segundo mensageiro (p. ex., AMPc) (Cap. 40). Alguns receptores de neurotransmissores estão acoplados a **canais iônicos**.

Os neurotransmissores são normalmente inativados após suas ações na célula-alvo. A hidrólise é um mecanismo importante para esse efeito. O exemplo mais bem estudado é

o da enzima acetilcolinesterase. Pode existir, igualmente, regulação ao nível do segundo mensageiro, como o AMPc, que é quebrado pela enzima fosfodiesterase. A fosfodiesterase é inibida pela cafeína e outras metilxantinas, pelo que elas mimetizam muitos dos efeitos da neurotransmissão adrenérgica.

A transmissão sináptica envolve a reciclagem dos componentes da membrana

Além da liberação de um neuro-hormônio específico, existe também um amplo sistema para a reciclagem dos constituintes da membrana associados a esse processo. As vesículas sinápticas contêm uma concentração muito alta do neurotransmissor de interesse, que está contido por uma membrana (Cap. 42.1). Durante a liberação sináptica do transmissor, ocorre a fusão da membrana da vesícula sináptica (contendo o neurotransmissor) com a membrana pré-sináptica. Esse aumento na massa total da membrana é corrigido pela invaginação das faces laterais dos terminais nervosos, em que um movimento de dobra para dentro da membrana é efetivado pelos movimentos contráteis da proteína clatrina. A partir daí, segue-se uma forma de pinocitose do excesso da membrana, que é transportada de maneira retrógrada em direção ao núcleo, para ser digerida pelos lisossomos.

Tipos de sinapses

Devido à grande diversidade de aferências sinápticas para um determinado neurônio, a soma algébrica final resulta em uma "decisão", ao nível do cone de implantação do axônio (local de origem do axônio a partir do corpo celular), em relação a transmitir ou não um potencial de ação ao longo do axônio como um fenômeno "tudo ou nada". Entretanto, mesmo antes que essa decisão seja tomada, o estímulo de entrada de um determinado neurotransmissor pode basicamente ser classificado como **excitatório** ou **inibitório.**

Além de as decisões serem tomadas em tempo relativamente curto em relação aos potenciais de ação (Cap. 42.1), existe uma modulação de longa duração do potencial de repouso da membrana, deslocando-o para mais perto (excitação) ou mais longe (inibição) do potencial crítico da membrana, que é o nível no qual o potencial de repouso da membrana irá finalmente disparar um potencial de ação no cone de implantação do axônio. Muitos fármacos, além do efeito de curta duração, têm um efeito prolongado na modulação, o que explica em parte seu efeito aditivo: isso pode ser observado em relação ao álcool ou aos fármacos opioides. Existem também efeitos prolongados durante o tratamento com vários fármacos, como, por exemplo, os utilizados no tratamento da depressão endógena, cujo efeito benéfico só aparece após semanas de uso.

Transmissão colinérgica

O neurotransmissor mais bem estudado é a acetilcolina

A acetilcolina (ACh) é sintetizada no compartimento citoplasmático dos terminais

nervosos colinérgicos a partir da acetil-CoA e da colina pela colina acetiltransferase. A enzima é expressa exclusivamente nos neurônios colinérgicos. A acetil-CoA é sintetizada a partir do piruvato derivado da glicólise, enquanto a colina é captada do compartimento extracelular pelo sistema de captação de colina de alta afinidade dirigido pelo potencial de membrana plasmática.

Como um sistema modelo, esse transmissor pode ter dois efeitos diferentes, dependendo do local de origem no sistema nervoso (isto é, central ou periférico): os efeitos originariamente demonstrados pelos experimentos com **nicotina** são característicos do receptor nicotínico, enquanto os demonstrados com a **muscarina** caracterizam os receptores muscarínicos. O tipo de transmissão nicotínica é exercido por neurônios motores localizados no tronco cerebral e nos cornos anteriores da medula oblonga. Outro grupo de neurônios colinérgicos centrais localizados no septo cerebral desempenha um papel-chave nas funções cognitivas básicas e superiores pela ativação de receptores muscarínicos pós-sinápticos. Há uma imagem complexa dos agonistas e antagonistas associados às ações regionais da ACh (Fig. 41.2.3). O antagonista clássico do efeito muscarínico é a **atropina**, e o bloqueador mais bem estudado para os receptores nicotínicos é um veneno de cobra, a α-**bungarotoxina**.

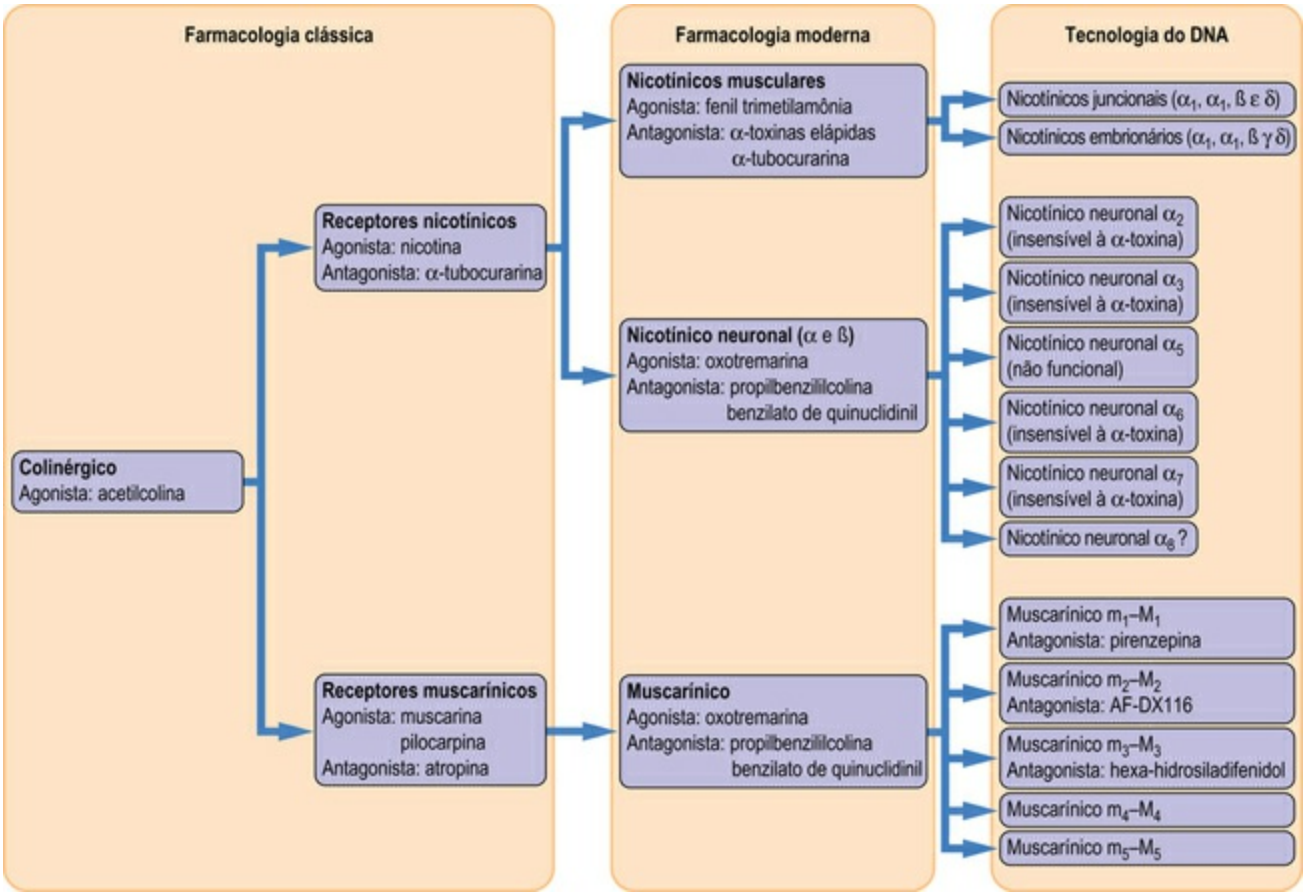


FIG. 41.2.3 História da nomenclatura: agonistas e antagonistas de acetilcolina.
As alterações da nomenclatura para os agonistas e os antagonistas das diferentes ações nas regiões centrais (neuronal) *versus* periférica (músculo) da acetilcolina (ACh).

Na **doença de Alzheimer**, a amiloide-β (1-42), em combinação com outros fatores neurotóxicos, causa comprometimento preferencial dos neurônios colinérgicos no septo

cerebral, originando perda progressiva da função cognitiva, a qual conduz a demência. Nos estágios mais precoces dessa doença, os inibidores da acetilcolinesterase com propriedades de agonistas do receptor M_2 melhoraram as funções cognitivas, mas não surtiram efeito na progressão da doença. Os antagonistas dos receptores n-metil--D-aspartato (NMDA) glutamatérgicos são empregados na redução dos efeitos excitotóxicos da ativação excessiva dos neurônios glutamatérgicos.

Na **miastenia grave**, os autoanticorpos são formados contra o receptor nicotínico. Entretanto, pelo bloqueio da hidrólise da ACh, por exemplo, por meio do fármaco edrofônio (que inibe a acetilcolinesterase), pode-se efetivamente aumentar a concentração de ACh (Cap. 42.1).

Os neurônios colinérgicos periféricos estão localizados nos gânglios parassimpáticos e inervam todos os tecidos viscerais. Eles dilatam os vasos sanguíneos do trato gastrintestinal e acentuam a salivação e o peristaltismo. Eles também promovem a constrição das vias aéreas, controlam a função cardíaca, fomentam a constrição das pupilas, regulam a acomodação do cristalino e estimulam a excitação sexual e a ereção genital.

Transmissão catecolaminérgica

As catecolaminas, a epinefrina e a norepinefrina, são sintetizadas a partir da l-tirosina na sequência de reações catalisadas pela tirosina hidroxilase/descarboxilase dos aminoácidos aromáticos e, em seguida, pela dopamina β-hidroxilase e a fentolamina-*N*-metiltransferase, originando a dopamina, a norepinefrina e a epinefrina, respectivamente. A dopamina é um precursor da norepinefrina e da epinefrina.

A **dopamina** é um transmissor nos neurônios dopaminérgicos localizados nas diversas áreas cerebrais, incluindo a substância negra. Eles estão envolvidos na aprendizagem motivada por recompensa, regulação do humor, atenção, aprendizagem e liberação da prolactina através de diferentes classes de receptores da dopamina ($D_{1\text{-}5}$). As perturbações do metabolismo da dopamina estão associadas a várias patologias do sistema nervoso central, incluindo a **doença de Parkinson**, a **esquizofrenia** e a **síndrome das pernas inquietas**. Para contornar os déficits de dopamina em algumas dessas doenças, é administrada a l-dopa, sua precursora, já que atravessa facilmente a barreira hematoencefálica. A dopamina é fornecida aos pacientes em **choque e com falha cardíaca** para elevar o débito cardíaco e aumentar a pressão sanguínea e a filtração renal. Vários fármacos, incluindo as anfetaminas, a cocaína e a nicotina, exercem seus efeitos comportamentais e aditivos mediante ao estímulo excessivo da liberação e do aumento de dopamina na fenda sináptica. Eles também estimulam a transmissão serotoninérgica e norepinefrinérgica no cérebro.

A **norepinefrina** e a **epinefrina** são sintetizadas no cérebro e nos gânglios simpáticos periféricos pelos respectivos grupos de neurônios, atuando como neurotransmissores. Por outro lado, as catecolaminas liberadas na circulação a partir de células cromafins exercem efeitos endócrinos. No cérebro, elas exercem funções reguladoras em processos de tomada de decisão. Perifericamente, elas aumentam a pressão sanguínea (causam

vasoconstrição e aumentam a taxa e a força da contração do músculo cardíaco), causam dilatação brônquica e das pupilas, inibem o peristaltismo, aumentam a sudorese e a secreção de renina e promovem a ejaculação. **Suas ações são mediadas por dois receptores separados: o receptor α-adrenérgico, bloqueado pela fentolamina, e o receptor β-adrenérgico, bloqueado pelo propranolol.** O segundo fármaco foi comumente usado pelos cardiologistas (outros β-bloqueadores são a base do tratamento na doença cardíaca coronariana), mas os neurologistas também o usam como parte do tratamento da doença de Parkinson. Muitos efeitos adrenérgicos são mediados pelo AMPc (Cap. 42.1).

A ação das catecolaminas é terminada por sua recaptação e degradação a aldeídos por monoamina oxidases mitocondriais e subsequente metilação pela catecol-*O*-**metiltransferase** em ácidos homovanílico ou vanilmandélico, que são excretados na urina. O excesso desses compostos na urina pode indicar a presença de um tumor na medula adrenal, o **feocromocitoma**.

Glutamato: transmissão glutamatérgica

Dependendo da região cerebral, 50-80% da população neuronal é glutamatérgica

O nível médio de L-glutamato no cérebro está na faixa dos 5-10 mmol/L. Ele é sintetizado a partir do α-cetoglutarato pela glutamato desidrogenase e aminotransferases ou a partir da glutamina pela glutaminase ativada pelo fosfato. O complexo L-glutamato/glutamato-zinco é captado pelas vesículas sinápticas dos terminais nervosos pré-sinápticos glutamatérgicos, onde ele atinge concentrações que excedem os 100 mmol/L. O glutamato é liberado após despolarização, atingindo transientemente elevadas concentrações nas fendas sinápticas. Sua ligação a diferentes classes de receptores, incluindo o NMDA (o principal), causa a despolarização/ativação de neurônios receptores pós-sinápticos. A estimulação de receptores glutamatérgicos está sujeita a múltiplas regulações, que desempenham um papel importante na plasticidade sináptica, denominada potenciação de longo prazo. Esse fenômeno tem lugar no hipocampo e nas diferentes regiões do córtex cerebral e está envolvido na aprendizagem, na formação da memória e em outras funções cognitivas.

O glutamato é rapidamente captado a partir do espaço sináptico por transportadores específicos expressos majoritariamente nas células adjacentes da astróglia. Aí, a glutamina sintetase converte o glutamato em glutamina, que é subsequentemente transportada de novo para os neurônios glutamatérgicos.

A liberação excessiva de glutamato ou sua captação comprometida, que ocorrem, entre outras situações, na isquemia, hipoglicemia e exposição a xenobióticos neurotóxicos, pode causar o seu excessivo acúmulo no espaço extracelular. Isso, por sua vez, causa a despolarização prolongada das células receptoras e, consequentemente, dano excitotóxico. A **epilepsia** é a condição patológica causada pela excessiva liberação de glutamato por neurônicos glutamatérgicos patologicamente estimulados e/ou na deficiência de transmissão GABAérgica inibitória (ver adiante).

Ácido γ-aminobutírico (GABA): transmissão GABAérgica

O GABA é o principal neurotransmissor inibitório no cérebro

O efeito inibitório do GABA nos neurônios pós-sinápticos resulta da ligação a receptores específicos $GABA_A$. A concentração de GABA permanece na faixa de 4-6 mmol/L. É o ligante para os canais controlados por cloreto. Sua abertura após a ligação de GABA causa o fluxo de íons Cl^- para o neurônio, provocando sua hiperpolarização e inibição da função transmissora. O GABA é sintetizado pela L-glutamato descarboxilase presente no citoplasma dos neurônios GABAérgicos. A ação do GABA é terminada principalmente por sua captação pelos terminais pré-sinápticos, através do transportador de GABA de alta afinidade. O GABA pode, então, ser novamente carregado em vesículas ou metabolizado em succinato — um intermediário do ciclo do TCA. Vários agonistas do receptor $GABA_A$ e inibidores da captação de GABA ou da GABA transaminase são usados como fármacos sedativos, tranquilizantes ou ansiolíticos. Os grupos mais comuns incluem os **barbituratos, as benzodiazepinas, o hidrato de cloral e o valproato**. O etanol também atua como agonista do receptor $GABA_A$.

Canais iônicos

Mesmo em repouso, o neurônio trabalha para bombear íons ao longo dos gradientes iônicos

O neurônio "em repouso" está, todavia, continuamente bombeando sódio para fora e potássio para dentro da célula por meio de canais iônicos. Durante um potencial de ação, ocorre uma reversão momentânea desses movimentos iônicos, de tal forma que o sódio entra na célula e o potássio sai, repolarizando efetivamente a membrana em repouso (Cap. 41.1). As mutações dos canais de sódio podem ocorrer em diferentes sítios e originam a **paralisia periódica hipercalêmica**. O íon negativo, cloreto, se move por meio de canais independentes, os quais estão implicados em estados patológicos específicos, como a **miotonia**.

Os íons cálcio possuem uma função importante na sincronização da atividade neuronal

O movimento dos íons cálcio no interior das células fornece com frequência um "gatilho" para as células sincronizarem uma atividade, como a liberação sináptica do neurotransmissor. Essa sincronização dos movimentos também tem uma função importante no retículo sarcoplasmático do músculo (Cap. 20). Um exemplo de **mimetismo molecular** no interior do sistema nervoso central é a **síndrome de Lambert-Eaton**, uma doença que afeta predominantemente os canais de cálcio do subtipo P/Q. O paciente pode ter um carcinoma avenocelular (*oat cell*) primário do pulmão, e o sistema imunológico responde formando anticorpos contra essas células malignas. Entretanto, a malignidade e os canais de cálcio possuem um epitopo comum, cujo efeito é o bloqueio da liberação do neurotransmissor pelo terminal pré-sináptico causado pela resposta

imunológica. Esse efeito é análogo, contudo pode ser claramente distinto da **miastenia grave**, na qual o bloqueio é pós-sináptico.

Também é importante destacar que o bloqueio da liberação pré-sináptica do neurotransmissor pode ser explorado, de forma útil, pela aplicação terapêutica da toxina botulínica (uma proteína derivada de bactéria anaeróbica), a qual contém enzimas que hidrolisam as proteínas pré-sinápticas envolvidas na liberação dos neurotransmissores. Essa toxina é utilizada em casos especiais de espasticidade, como nos **torcicolos**, nos quais os pacientes podem apresentar um alívio do excesso de contratura dos músculos do pescoço que torcem a cabeça cronicamente para um lado, causando dor e desconforto se não tratado.



Quadro clínico

Jovem de 18 anos com fraqueza em braços e pernas: paralisia periódica familiar

Um jovem de 18 anos acordou durante a noite com fraqueza intensa dos músculos proximais de seus braços e pernas. Antes de se recolher ele se alimentou com massa e bolo. Seu irmão e seu pai já haviam apresentado anteriormente um quadro semelhante. Ele foi levado para a sala de emergência do hospital local, onde se observou que os membros com fraqueza estavam hipotônicos e com depressão do reflexo dos tendões. A concentração sérica de potássio estava levemente reduzida a 2,9 mmol/L (normal: 3,5-5,3). No dia seguinte, ele se recuperou completamente e o potássio sérico aumentou espontaneamente até os níveis normais. Outro ataque de paralisia foi induzido por uma infusão intravenosa de glicose, confirmando, assim, o diagnóstico de paralisia periódica familiar.

Comentário

Diferentes lesões moleculares nos diversos sítios dos poros do canal de sódio podem originar uma paralisia periódica hipercalêmica. Como o nome sugere, o paciente apresenta fraqueza muscular intermitente, com aumento da concentração de potássio sérico nesses períodos. Isso é causado por um desequilíbrio dos movimentos catiônicos, nos quais o sódio penetra na célula e o potássio sai. Nesses pacientes, o fluxo anormal de sódio no músculo não é corretamente regulado pelo contrafluxo de íons potássio (Cap. 8).



Quadro clínico

Mulher com visão turva progressiva, disfagia e fraqueza dos membros: botulismo

Vinte e quatro horas após comer vegetais em conserva, uma jovem saudável

apresentou início progressivo de visão turva, vômitos graves, disfagia e fraqueza progressiva dos membros, com início nos ombros. Seu médico a internou e os exames eletrofisiológicos confirmaram o diagnóstico clínico de botulismo. Foi feita a administração imediata de antissoro trivalente, feito de toxina inativa, e, com a ajuda de ventilação assistida, a paciente se recuperou em poucas semanas.

Comentário

Os vegetais continham uma exotoxina do microrganismo anaeróbico *Clostridium botulinum*, que não foi destruída durante o processo de preservação. A toxina hidrolisa as proteínas pré-sinápticas envolvidas na liberação do neurotransmissor e, assim, o bloqueio é semelhante à lesão funcional na síndrome miastênica de Lambert-Eaton; entretanto, no botulismo, o bloqueio pode ser letal, especialmente se atingir o músculo frênico, que é essencial para o movimento pulmonar respiratório apropriado.

O mecanismo da visão

O mecanismo pelo qual o olho humano pode detectar um único fóton de luz é um fascinante exemplo dos processos químicos subjacentes à função neuronal

O mecanismo da visão envolve a captura de fótons e o efeito transdutor pelo qual a energia da luz é convertida em uma forma química, que é, enfim, transmutada em um potencial de ação por um neurônio ganglionar da retina. Ainda não se conhecem precisamente os diversos intermediários, porém a hipótese subjacente é que a proteína receptora, a rodopsina, seja acoplada à proteína G. Existem diversas sequências homólogas entre a rodopsina e os receptores β-adrenérgicos e os muscarínicos de ACh. As principais etapas (Fig. 41.2.4) ocorrem na seguinte ordem:

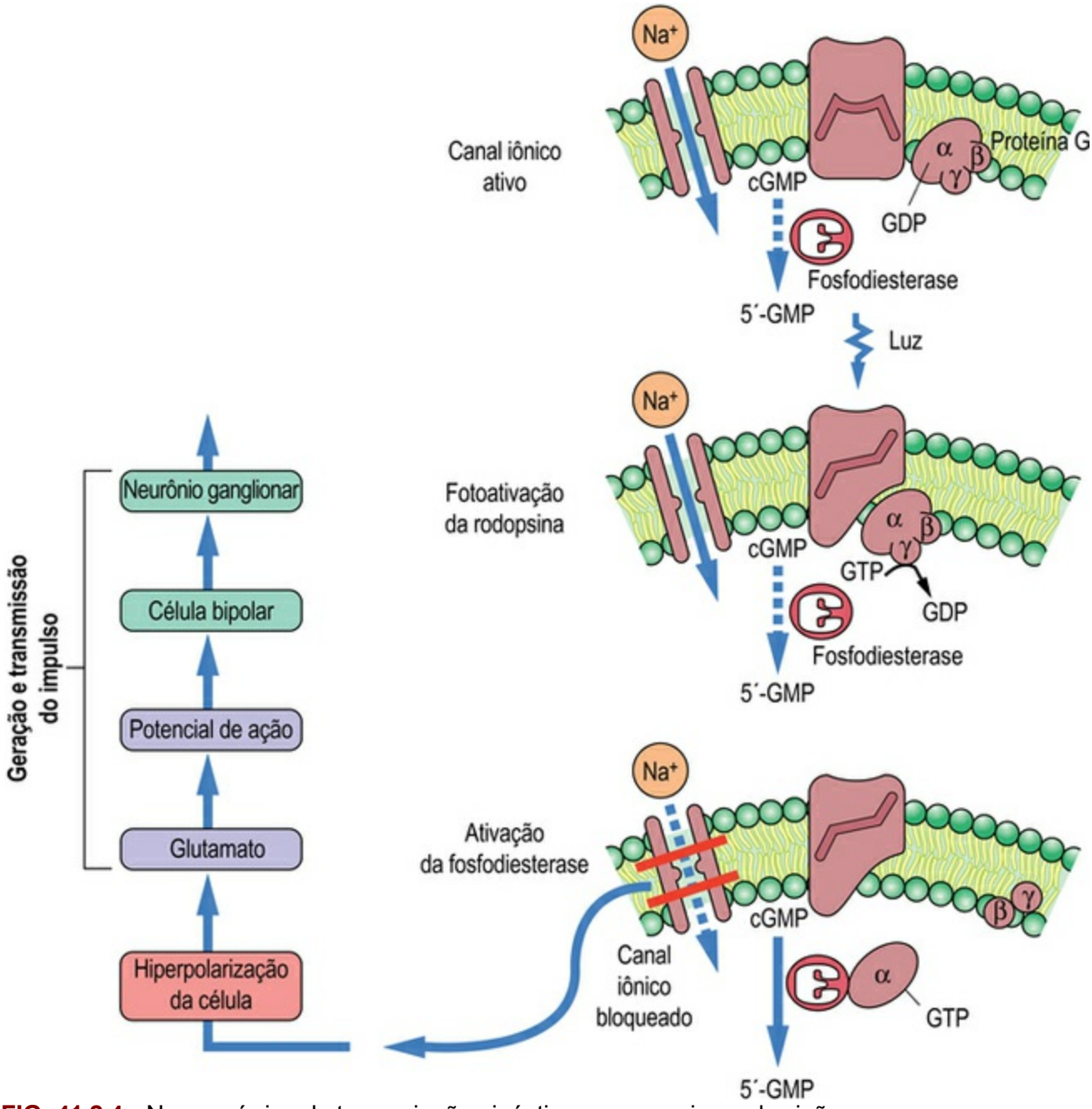


FIG. 41.2.4 Neuroquímica da transmissão sináptica no mecanismo da visão.
A figura mostra as consequências da fotoativação da rodopsina por meio do acoplamento à proteína G em uma célula bastonete. A fosfodiesterase é ativada e hidrolisa o segundo mensageiro, o GMPc, bloqueando assim a entrada de sódio e causando hiperpolarização da célula. Atualmente, os passos pelos quais a neurotransmissão prossegue subsequentemente para produzir o potencial de ação final no neurônio ganglionar não são conhecidos em detalhe. Compare as atividades dos receptores acoplados a proteínas G. A linha tracejada indica um processo inativo.

- o *cis*-retinal é convertido em *trans*-retinal;
- a rodopsina se torna ativada;
- o nível de GMPc diminui;
- a entrada de Na^+ na célula é bloqueada;
- as células bastonetes são hiperpolarizadas;
- ocorre a liberação de glutamato (ou aspartato);
- um potencial de ação despolariza a célula bipolar adjacente;
- este último evento despolariza o neurônio ganglionar associado para enviar um potencial de ação para fora do olho.

Resumo

- O sistema nervoso contém diversos tipos de células, sendo que cada qual sintetiza suas próprias proteínas individuais.
- As funções especializadas do sistema nervoso confirmam que essas proteínas são efetivamente compartimentalizadas em locais diferentes.
- Para facilitar a comunicação no interior do encéfalo, existem dois métodos especializados de movimentação das células, das organelas e das proteínas: o líquido cerebroespinal e o transporte axonal.
- A barreira hematoencefálica é diversa em sua origem anatômica e não é absoluta, mas sim relativa (especificamente baseada no tamanho molecular das moléculas transferidas).
- A síntese de anticorpos no líquido cerebroespinal, sem presença paralela no plasma, é uma evidência inequívoca de que o cérebro é a fonte de estimulação antigênica.
- Os neurotransmissores no cérebro são sintetizados e liberados nas fendas sinápticas a partir dos terminais axonais de grupos específicos de neurônios (glutamatérgicos, GABAérgicos, catecolaminérgicos, colinérgicos etc.).
- A atividade neuronal depende da função de canais iônicos tanto no sistema nervoso central quanto nos nervos periféricos.

Questões de aprendizado

1. As proteínas G são amplamente utilizadas em todo o organismo como agentes de "acoplamento" entre o primeiro mensageiro extracelular e o segundo mensageiro intracelular. Discuta algumas das diferentes funções pelas quais a proteína G foi adaptada entre os diferentes tipos de células.
2. A mitocôndria possui o importante papel de suprir as necessidades metabólicas nos nódulos de Ranvier ao longo de considerável extensão do axônio. Discuta o papel dos dois motores moleculares na reciclagem da mitocôndria necessários para a sustentação dessa função.
3. O cloreto é um ânion importante e que é parte integrante dos movimentos complexos com cátions como o sódio e o potássio durante a despolarização. Discuta as consequências de anormalidades congênitas no transporte de cloreto.
4. Descreva as reações que ocorrem no processo de visão.
5. Dê um exemplo de mimetismo molecular.

Leituras sugeridas

Barry, D. M., Millecamps, S., Julien, J. P., et al. New movements in neurofilament transport, turnover and disease. *Exp Cell Res*. 2007; 313:2110–2120.

Bettens, K., Sleegers, K., Van Broeckhoven, C. Genetic insights in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*. 2013; 12:92–104.

Bos, J. L., Rehmann, H., Wittinghofer, A. GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell*. 2007; 129:865–877.

Cannon, S. C. Physiologic principles underlying ion channelopathies. *Neurotherapeutics*. 2007; 4:174–183.

de Leon, M. J., Mosconi, L., Blennow, K., et al. Imaging and CSF studies in the preclinical diagnosis of Alzheimer's

disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2007; 1097:114–145.
George, D. R., Whitehouse, P. J., D'Alton, S., et al. Through the amyloid gateway. *Lancet*. 2012; 380:1986–1987.
Honig, L. S. Translational research in neurology. *Dementia, Arch Neurol*. 2012; 69:969–977.
Stein-Streilein, J., Taylor, A. W. An eye's view of T regulatory cells. *J Leukoc Biol*. 2007; 81:593–598.

CAPÍTULO 42

Homeostasia Celular: Crescimento Celular e Câncer

Alison M. Michie, Verica Paunović and Margaret M. Harnett

Objetivos

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Definir os estágios do ciclo celular dos mamíferos.
- Delinear como o ciclo celular é regulado por ciclinas e cinases dependentes de ciclinas.
- Descrever os eventos moleculares que permitem aos fatores de crescimento regular a proliferação celular.
- Discutir os diferentes mecanismos que permitem às células interromper a proliferação ou morrer.
- Definir os eventos moleculares e celulares que definem a apoptose e a autofagia.
- Explicar como a subversão do crescimento fisiológico normal leva ao desenvolvimento de tumores.
- Distinguir oncogenes de genes supressores tumorais e descrever seu papel na progressão/supressão tumoral.

Introdução

O desenvolvimento e a sobrevivência de organismos multicelulares, como os seres humanos, dependem da regulação apropriada do crescimento, diferenciação e morte dos tipos celulares individuais para manter a integridade do organismo

Apesar de as células terem desenvolvido um complexo conjunto de mecanismos de controle para impedir a replicação de células lesadas e permitir sua reparação, se os mecanismos de controle do crescimento ficarem danificados, pode desenvolver-se um câncer. A maioria das células no adulto não está em divisão. No entanto, em

determinadas circunstâncias, como a reparação tecidual e a senescência, o crescimento e a proliferação controlados são promovidos. Assim, à medida que as células morrem, quer por senescência ou como resultado de lesão tecidual, elas têm de ser substituídas de forma estritamente regulada. A homeostasia celular mantém a integridade dos órgãos mediante controle da sobrevivência, proliferação e morte celular, para garantir que as células saudáveis, ao contrário das células cancerígenas (transformadas), na generalidade, parem de se dividir quando entram em contato com células vizinhas.

A investigação em células cancerígenas tem destacado os importantes mecanismos que regulam o crescimento e a divisão celular em células normais

Por meio da investigação de alterações genéticas em células cancerígenas, tem sido possível a identificação de um grande número de genes críticos para a regulação da normal proliferação celular. É talvez sem surpresa que os mecanismos moleculares que favorecem os processos de sobrevivência e proliferação celulares se encontrem frequentemente sobrerregulados em cânceres humanos. Os genes proliferativos mutados são chamados **oncogenes** (genes causadores de câncer), e seus homólogos celulares normais são chamados **proto-oncogenes.** Estes são predominantemente transdutores de sinal que atuam para regular o crescimento e a divisão celulares normais; a regulação aberrante desses processos leva à transformação celular. Por outro lado, as proteínas envolvidas na supressão da proliferação ou **genes supressores tumorais** são geralmente inibidas durante a oncogênese, levando à proliferação descontrolada. A exploração do papel dessas proteínas em circunstâncias fisiológicas normais pode auxiliar na compreensão de como podem ser subvertidas quando se tornam desreguladas durante a oncogênese.

Ciclo celular

Células individuais dividem-se duplicando seus conteúdos e se dividindo, depois, em duas células filhas

A divisão celular é estreitamente regulada por um mecanismo complexo chamado ciclo celular. A duração do ciclo celular varia entre organismos, bem como entre diferentes tipos celulares dentro de um único organismo. Nos mamíferos, por exemplo, pode durar de minutos a anos. No entanto, em linhagens celulares imortalizadas, que são amplamente utilizadas como sistemas de modelo experimental, uma volta do ciclo celular tipicamente se completa em 24 horas.

Nos anos recentes, a pesquisa extensiva sobre o ciclo celular tem definido um número de pontos de controle-chave

Tradicionalmente, o ciclo celular é dividido em várias fases (Fig. 42.1). A mitose **(Fase M)** é a fase da divisão celular, que geralmente se completa em uma hora. O ciclo celular restante, durante o qual a célula se prepara para a divisão e duplica o ácido desoxirribonucleico (DNA), é referido como interfase. A replicação do DNA nuclear

ocorre na fase de síntese **(S)** da interfase. O período entre as fases M e S é chamado fase **G1,** enquanto o intervalo entre as fases S e M é chamado fase **G2.** Durante as fases G1 e G2, a célula passa por vários pontos de controle para assegurar que ocorre um crescimento celular apropriado e uma síntese de DNA exata antes da divisão celular, prevenindo assim a incorporação de DNA mutado nas células filhas. Tal como mencionado anteriormente, a duração de um ciclo celular individual varia enormemente, e a maior parte dessa variabilidade pode ser atribuída à diferente duração da fase G1. Isso se deve ao fato de algumas células, que não são estimuladas a duplicar seu DNA, poderem entrar na forma especializada da fase G1, chamada fase **G0.**

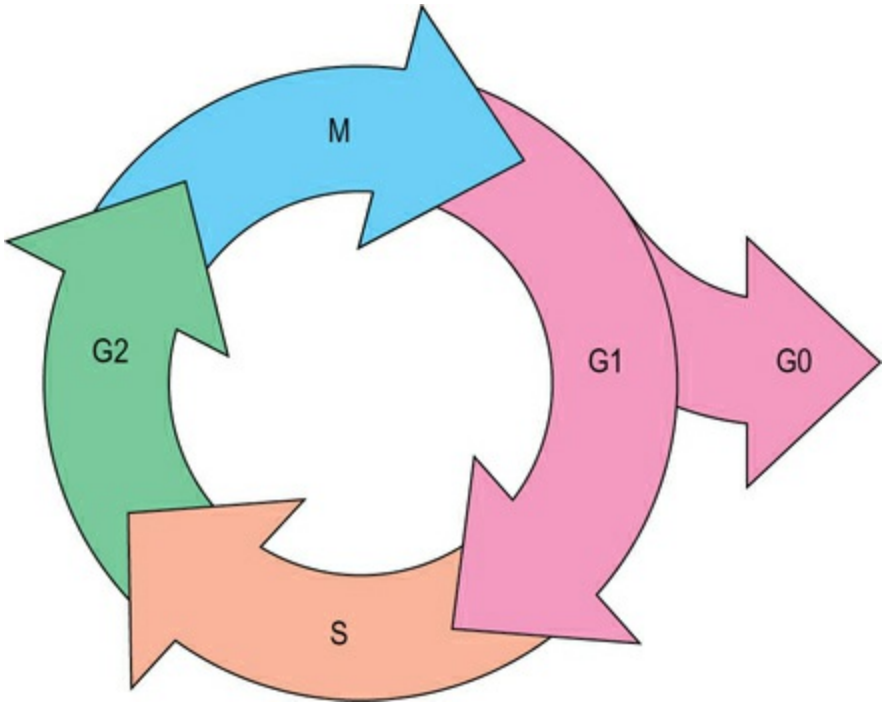


FIG. 42.1 As fases do ciclo celular.
O ciclo celular é divido em interfase e fase mitótica. Na interfase, composta pelas fases G1, S e G2, as células crescem, preparam-se para a divisão e duplicam o seu DNA. A mitose é o estágio da divisão celular em duas células filhas. M, mitose; S, fase sintética da interfase; G1, intervalo entre as fases M e S; G2, intervalo entre as fases S e M; G0, fase de repouso ou quiescente.

A fase G0 é uma forma de estado de repouso, ou quiescência, em que as células se mantêm até que recebam sinais apropriados: por exemplo, por fatores de crescimento, incitando-as a reentrar e a progredir por meio do ciclo celular

Nos mamíferos, o tempo requerido para uma célula passar do início da fase S até a mitose é normalmente 12-24 horas, independentemente da duração da fase G1. Assim, a maior parte da oscilação nas velocidades de proliferação observadas em diferentes tipos celulares deve-se à quantidade de tempo despendido na fase G0/G1. Em condições que favoreçam o crescimento celular, o conteúdo total de ácido ribonucleico (RNA) e de proteína da célula aumenta continuamente, exceto na fase M, em que os cromossomos estão excessivamente condensados para permitir que a transcrição ocorra.

É notável que a maioria das células no corpo humano se retiraram irreversivelmente do ciclo celular para um estado de diferenciação terminal (neurônios, miócitos ou células

epiteliais superficiais da pele e mucosas), ou estão na fase quiescente reversível G0 (células estaminais, células gliais, hepatócitos ou células foliculares da tireoide). Normalmente, apenas uma minoria das células está ativamente em ciclo, e estas estão localizadas principalmente nos compartimentos estaminais/de trânsito em tecidos capazes de autorrenovação, que incluem a medula óssea e os epitélios.

Regulação da proliferação e crescimento celular: os fatores de crescimento

As células de um organismo multicelular precisam receber sinais positivos para crescer e se dividir

Vários desses sinais são sob a forma de hormônios polipeptídicos (p. ex., a insulina), fatores de crescimento (p. ex., o fator de crescimento epidérmico [EGF]) ou citocinas (p. ex., interleucinas IL-1 até IL-36). Esses fatores de crescimento se ligam a receptores de superfície celular específicos, iniciando uma intricada rede de cascatas de sinalização intracelular que se opõem aos controles reguladores negativos presentes nas células em repouso para bloquear a progressão no ciclo celular e divisão.

Na maioria dos tipos celulares, a proliferação é controlada por sinais gerados a partir de uma combinação específica de fatores de crescimento, e não pela estimulação de um único fator

Desta forma, um número relativamente pequeno de fatores de crescimento pode regular seletivamente a proliferação de vários tipos celulares. Além disso, alguns dos fatores podem induzir o crescimento celular sem fornecer um sinal para a divisão. De fato, os neurônios na fase G0 do ciclo celular crescem muito sem se dividir. Adicionalmente, apesar de as células em proliferação poderem parar de crescer quando estão privadas de fatores de crescimento, continuam o seu progresso ao longo do ciclo celular até atingirem o ponto na fase G1, em que podem entrar em fase G0 (estado de repouso) ou entrar em senescência.

Os fatores de crescimento se ligam a receptores de superfície celular específicos. Existem cerca de 50 fatores de crescimento conhecidos

Os fatores de crescimento se ligam aos seus receptores de superfície celulares específicos expressos nas células efetoras, que são geralmente proteínas transmembranares com um domínio de ligação ao fator de crescimento (ou ligando) e um domínio citoplasmático de proteína tirosina cinase (PTK). Existem cerca de 50 fatores de crescimento conhecidos, dos quais o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) foi o primeiro identificado. As respostas de crescimento e proliferação ao PDGF são prototípicas para vários fatores de crescimento e incluem:

- Aumento imediato dos níveis de Ca^{2+} intracelulares — indicando a iniciação da sinalização transmembranar.
- Reorganização das fibras de estresse de actina — para permitir a adesão celular

dependente da ancoragem, um requisito para a progressão no ciclo celular.

- Ativação e/ou translocação nuclear de fatores de transcrição que se ligam a regiões reguladoras do DNA codificadoras de genes responsivos a fatores de crescimento específicos. Esses genes são referidos como precoces imediatos, os quais geralmente codificam eles próprios fatores de transcrição que medeiam a expressão de componentes da maquinaria do ciclo celular, como as ciclinas.
- Síntese de DNA e divisão celular.

Os fatores de crescimento iniciam cascatas de sinalização seletivas

Fatores de crescimento individuais ativam distintos cortes de moléculas de sinalização e fatores de transcrição que, por sua vez, induzem um repertório único de expressão gênica. Desta forma, fatores de crescimento específicos iniciam respostas diferenciais características que têm um impacto único no comportamento celular.

Os fatores de crescimento iniciam cascatas de sinalização seletivas ao ligarem-se aos seus receptores

A ligação a um receptor causa sua dimerização ou oligomerização e a ativação do domínio intracelular tirosina cinase, que, por sua vez, medeia a transfosforilação do receptor em aminoácidos específicos dentro do domínio citoplasmático. A região fosforilada do receptor é então capaz de atuar como **"sítio de ancoragem"** para a ligação de proteínas específicas, permitindo interações proteína-proteína (Fig. 42.2). Esse processo leva ao recrutamento e ativação de mais moléculas de sinalização, como enzimas e **moléculas "adaptadoras",** que medeiam a propagação da cascata de sinalização intracelular a partir da superfície da membrana plasmática para o interior da célula. A transfosforilação de domínios citoplasmáticos de receptores cria um **suporte estrutural para a ligação de elementos de transdução de sinal,** como a fosfolipase Cγ (PLC-γ), proteínas ativadoras da GTPase (GAPs), PTKs não receptor (Src, Fyn, Abl), fosfotirosina fosfatases (PTPases) e moléculas adaptadoras (Shc ou Grb2), por meio de seus domínios de reconhecimento fosfotirosina.

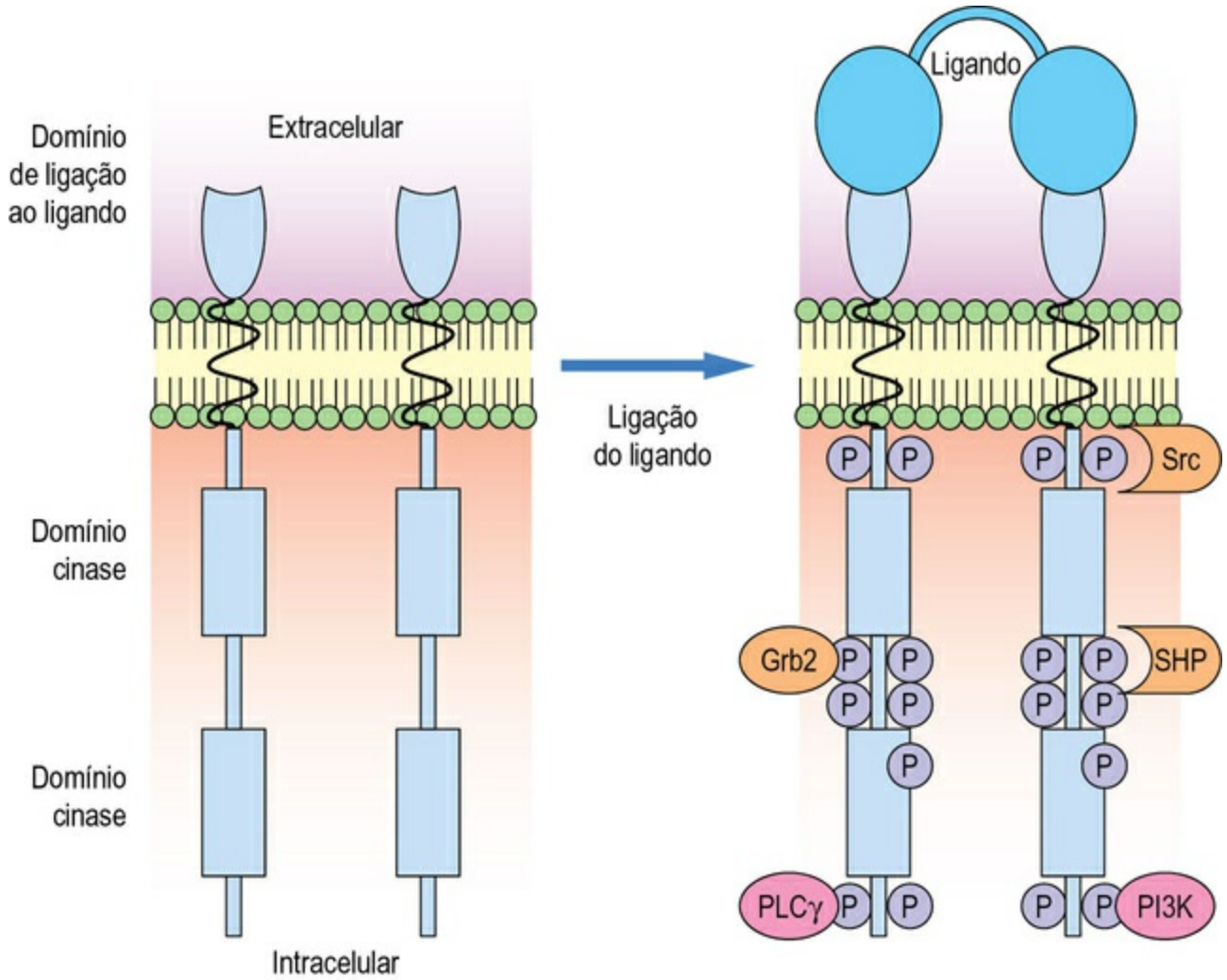


FIG. 42.2 Ativação do receptor de fator de crescimento pela ligação do ligando e recrutamento de moléculas de sinalização.
A ligação de um fator de crescimento (como o PDGF ou EGF) ao seu receptor causa a dimerização do receptor e a ativação da tirosina cinase, intrínseca aos domínios citoplasmáticos do receptor. Essa ativação leva à fosforilação de tirosinas dos receptores dimerizados em locais específicos dos domínios citoplasmáticos mediante o processo de transfosforilação. Os eventos de fosforilação criam locais de ancoragem que permitem interações proteína-proteína entre o receptor e os componentes de sinalização a jusante, como a PLC-γ, a proteína tirosina cinase Src, a tirosina fosfatase SHP, a PI3K e as moléculas adaptadoras, como a Grb2, que por sua vez recrutam a via da *Ras*/MAPK. PLC-γ, fosfolipase Cγ; PI3K, fosfatidilinositol 3-cinase; Grb2, proteína ligada ao receptor do fator de crescimento 2; SHP, fosfatase contendo domínio SH2.

Sinalização do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGF)

Quando da ligação de um ligando, o receptor do EGF (EGFR) leva à ativação de sinais por intermédio das cascatas de sinalização mediadas por fosfatidilinositol, Ras/Raf/MAPK e PI3K/Akt/mTOR

O receptor EGF (EGFR) pode ser ligado e ativado por um conjunto de ligandos incluindo o EGF e o fator transformador de crescimento α (TGF-α). A ligação ao EGFR leva ao recrutamento e ativação da família Src das PTKs, que catalisa a fosforilação da PLC-γ, levando à ativação desta enzima. A PLC-γ ativada catalisa depois a hidrólise do

fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2) para originar os segundos mensageiros intracelulares, inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG). O IP_3 estimula a libertação de Ca^{2+} das reservas intracelulares (principalmente do RE) e o DAG ativa uma família importante de proteínas transdutoras de sinal, a família da proteína cinase C (PKC). A ligação ao EGFR também induz a ativação de outra enzima modificadora de lipídios, a fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K). Essa enzima medeia a fosforilação do PIP_2, formando o segundo mensageiro lipídico fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP_3), que contribui para a ativação de determinados membros da família da PKC (Fig. 42.3). Além disso, o PIP_3 pode ativar outra cinase referida como cinase dependente do PIP_3 (PDK1) ou servir como sítio de ancoragem para proteínas que contêm os chamados domínios de homologia de plecstrina (PH).

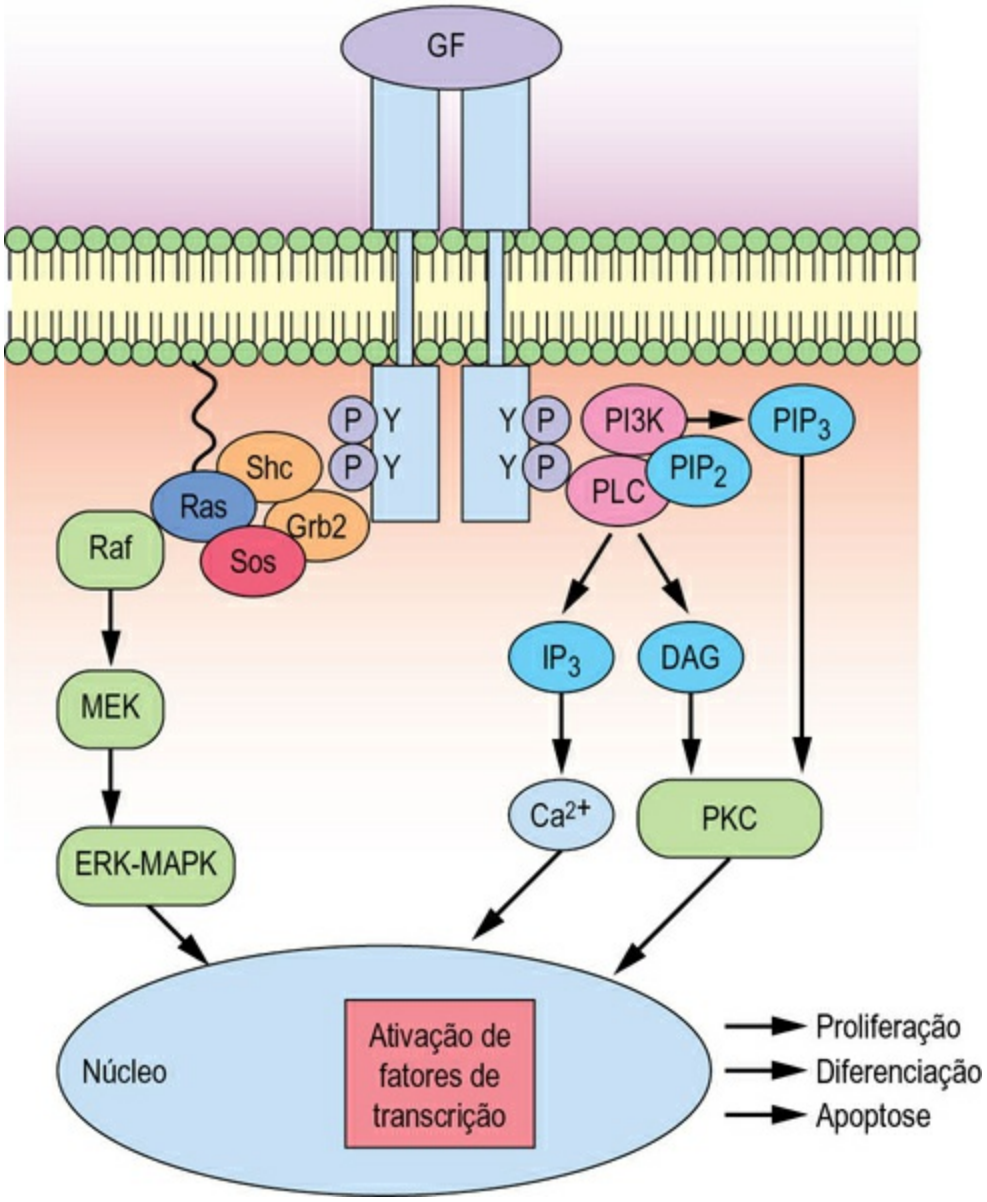


FIG. 42.3 Ativação das cascatas de sinalização da ERK-MAPK e da PKC após ligação de um fator de crescimento.
Os sinais de fator de crescimento ativado na membrana plasmática como resultado da ligação de um ligando podem regular a transcrição de genes, a progressão no ciclo celular, a proliferação, a diferenciação e a apoptose. Os sinais do receptor de fator de crescimento ativam sinais proximais para recrutar as moléculas adaptadoras Grb2 e Shc, que levam à ativação das vias da ERK-MAPK, da PI3K/Akt e da PKC. A ativação destas vias leva à ativação de fatores de transcrição, como o Jun e o Fos (que dimerizam para formar o AP1), o NFAT e o Myc. Estes regulam a indução de componentes da maquinaria do ciclo celular que controlam a progressão no ciclo e identificam a necessidade de reparação do DNA. Se forem detectados danos no DNA, o ciclo celular é interrompido, e se os danos forem excessivamente grandes, então a apoptose é induzida. GF, fator de crescimento; DAG, diacilglicerol; IP_3, inositol 1,4,5-trifosfato; PI3K, fosfatidilinositol 3-cinase; PIP_2, fosfoinositol 4,5-bifosfato; PIP_3, fosfoinositol 3,4,5-trifosfato; PKC, proteína cinase C; PLC, fosfolipase C; Shc, proteína de homologia ao Src e de domínio de colágeno.

A cascata de sinalização que envolve a *Ras* GTPase é importante na regulação da divisão celular

Um quarto de todos os tumores têm mutações constitutivamente ativas no componente de sinalização Ras, que é crítico para a transmissão de sinais de proliferação e diferenciação a partir de receptores extracelulares para o núcleo. O Ras está

constitutivamente ligado à membrana plasmática por meio de uma modificação pós-traducional envolvendo a adição de grupo farnesil lipofílico. A ligação do EGFR recruta o Ras pela sua ligação à proteína adaptadora Grb2. O Ras é uma GTPase que alterna entre uma forma ativa ligada ao GTP e uma forma inativa ligada ao GDP (Fig. 42.4). Sua atividade catalítica intrínseca é baixa e é ampliada pela ligação a uma proteína ativadora da GTPase (GAP). A troca de GDP/GTP é promovida pela ligação a um fator de troca de nucleotídio de guanina, chamado Sos, que devolve o Ras a um estado ativo. Uma das principais funções do Ras ativo é agir como regulador alostérico da cascata de sinalização da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK). O Ras traduz sinais a partir do EGFR mediante a ativação de duas cinases intermediárias, as cinases Raf e MEK. A MEK é uma cinase do tipo MAPK, que ativa a MAPK ao mediar a fosforilação de dupla especificidade dos resíduos de tirosina e treonina, no motivo de ativação TEY. A MAPK existe em duas isoformas, as cinases reguladas por sinal extracelular (ERK) 1 e 2. Após ativação, estas sofrem translocação para o núcleo e fosforilam (em serinas e treoninas) fatores de transcrição-chave, envolvidos na regulação da transcrição de genes que regulam a síntese de DNA e a divisão celular.

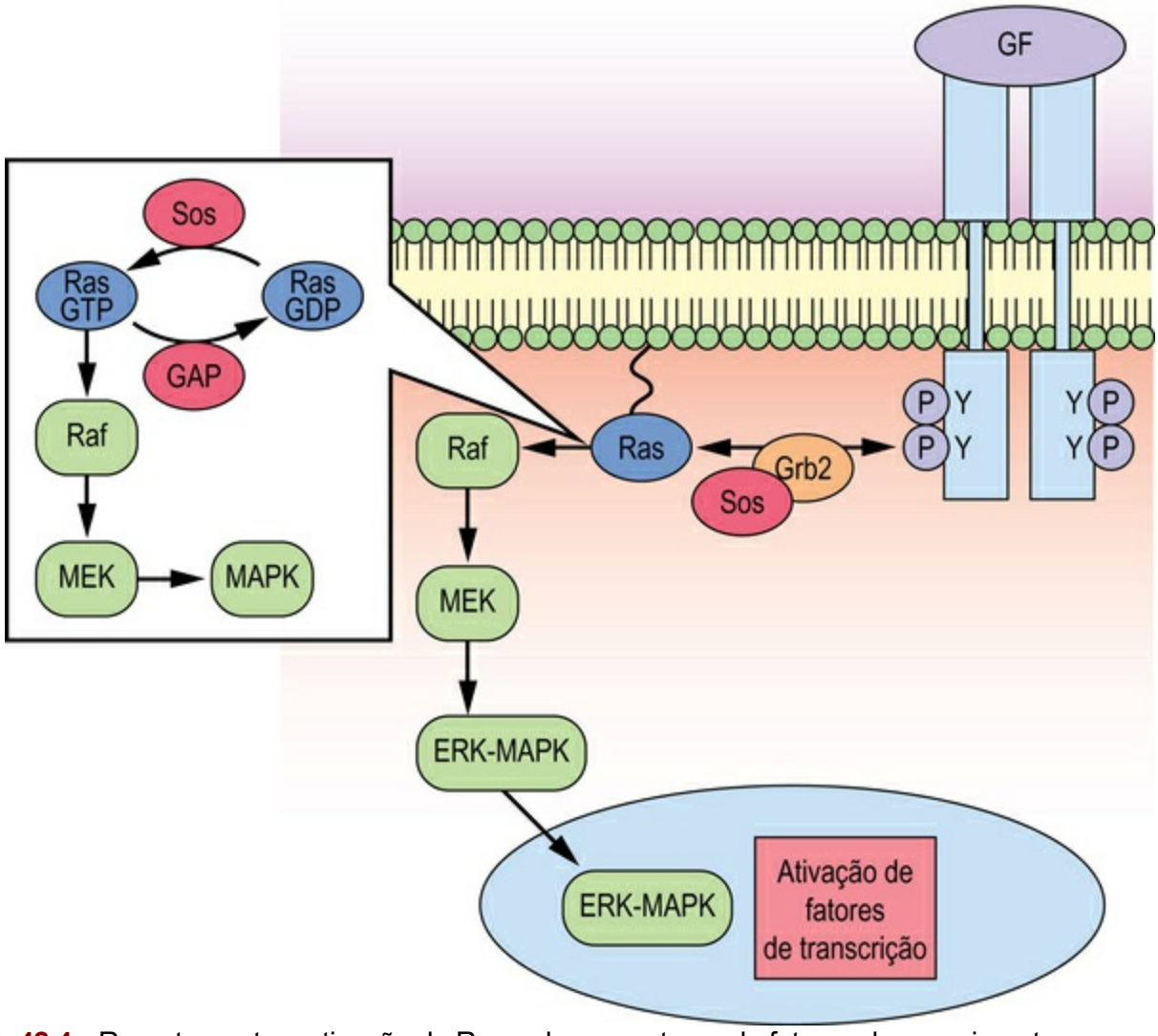


FIG. 42.4 Recrutamento e ativação do Ras pelos receptores de fatores de crescimento. O Ras está ancorado na membrana plasmática e é recrutado para o receptor de fator de crescimento ativado por meio da interação com o complexo Grb2-Sos. A troca GTP/GDP estimulada pelo receptor e, portanto, a ativação do Ras é promovida pela Sos, enquanto a GAP inativa o Ras ao estimular sua atividade GTPase intrínseca. O Ras acopla os receptores de fator de crescimento à cascata de sinalização da MAPK mediante a estimulação das cinases intermediárias Raf e MEK. A MAPK sofre translocação para o núcleo e fosforila fatores de transcrição-chave envolvidos na regulação da síntese de DNA e na divisão celular. GF, fator de crescimento; GAP, proteína ativadora da GTPase; MAPK, proteína cinase ativada por mitógeno; Sos, *son of sevenless*.

Quadro de conceitos avançados

Proteínas tirosina cinase

Papel na transdução de sinal

As proteínas tirosina cinase (PTKs) são enzimas que transferem o grupo γ-fosfato do ATP para resíduos de tirosina das proteínas-alvo. A expressão "proteína tirosina cinase" é um termo genérico para uma grande superfamília de enzimas que compreende tanto os receptores transmembranares com atividade tirosina cinase intrínseca em seus domínios citoplasmáticos (p. ex., alguns receptores de fator de crescimento) quanto uma grande variedade de subfamílias de tirosina cinases

citoplasmáticas, como as famílias Src, Abl, Syk, Tec ou Janus cinase (JAK).

A fosforilação da tirosina é uma modificação covalente das proteínas que fornece um mecanismo rápido e reversível (pela ação das proteínas tirosina fosfatases) de alteração da atividade enzimática das proteínas-alvo e de modificação dessas proteínas, para que possam atuar como adaptadores com o fim de recrutar outras moléculas de sinalização.

Por exemplo, a fosforilação de resíduos de tirosina dos receptores ou moléculas de sinalização cria "sítios de ancoragem" que permitem interações proteína-proteína por meio de domínios de interação proteína-proteína, tais como os chamados domínios SH2, contidos dentro da sequência de outros transdutores de sinal. SH2 representa a região 2 de homologia Src da tirosina cinase Src citoplasmática, um elemento de transdução de sinal no qual esse domínio proteico foi primeiramente caracterizado. Os domínios SH2 compreendem aproximadamente 100 aminoácidos e reconhecem especificamente uma fosfotirosina no contexto dos três aminoácidos seguintes na direção *C*-terminal a essa fosfotirosina.

Papel na regulação da proliferação, sobrevivência e diferenciação celular

As PTKs desempenham um papel fundamental na regulação da proliferação, sobrevivência e diferenciação celular, e a importância destes eventos reguladores é salientada pelos defeitos que são observados após a desregulação de genes que codificam PTKs. De fato, a expressão desregulada de receptores de fator de crescimento contendo atividade PTK intrínseca pode levar à ativação constitutiva das vias de sinalização Ras/Raf/MEK/ERK e Ras/PI2K/Akt/mTOR, acarretando crescimento, sobrevivência e proliferação celular aumentadas e subversão de eventos moleculares que regulam a apoptose, eventos esses que se encontram desregulados no câncer. Foram identificadas mutações específicas no PDGFR, EGFR, Kit e Flt3 em tipos de câncer específicos. De fato, mutações na família EGFR de receptores são responsáveis por 30% de todos os cânceres epiteliais, incluindo os cânceres de pulmão e cerebral.

As tirosinas cinase não receptoras desempenham também papéis fundamentais nas respostas celulares, com mutações que levam a uma perda na atividade cinase, resultando em sérias anormalidades no desenvolvimento de linfócitos T e B. Por exemplo, a perda de atividade/expressão da ZAP-70, uma PTK essencial para a ativação dependente de antígeno das células T, pode levar à **imunodeficiência severa combinada (SCID)** devido à ausência de função efetora das células T durante um desafio imunitário. De forma semelhante, a **agamaglobulinemia ligada ao X,** uma imunodeficiência causada por ausência de produção de anticorpo IgG, ocorre como resultado de mutações causadoras de perda de função da Btk, uma PTK que é importante nas funções efetoras das células B.

Os complexos mTORC-1 e mTORC-2 integram sinais mitogênicos e nutricionais

Além de atuar em membros seletivos da família da PKC, a PI3K é também responsável pela ativação da PKD1, que, por sua vez, ativa a Akt. Essa enzima medeia a atividade do alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), uma proteína cinase serina/treonina. O

mTOR pode participar em dois complexos de sinalização distintos, o mTORC-1 e o mTORC-2, integrando sinais mitogênicos e nutricionais para promover a sobrevivência, o crescimento e a proliferação celulares. A ativação da PI3K/Akt pela ligação do receptor leva à fosforilação da proteína da esclerose tuberosa 1/2 (TSC1/2), resultando na ativação do mTORC-1. Os efetores a jusante do mTORC-1 mais bem caracterizados são reguladores traducionais da via de síntese de proteínas, a proteína de ligação ao fator de iniciação 4E (eIF4E) 1 (4E-BP1) e a cinase ribossomal S6 1 (S6K1), que são estimuladas pela fosforilação mediada pelo mTORC-1 (Fig. 42.5).

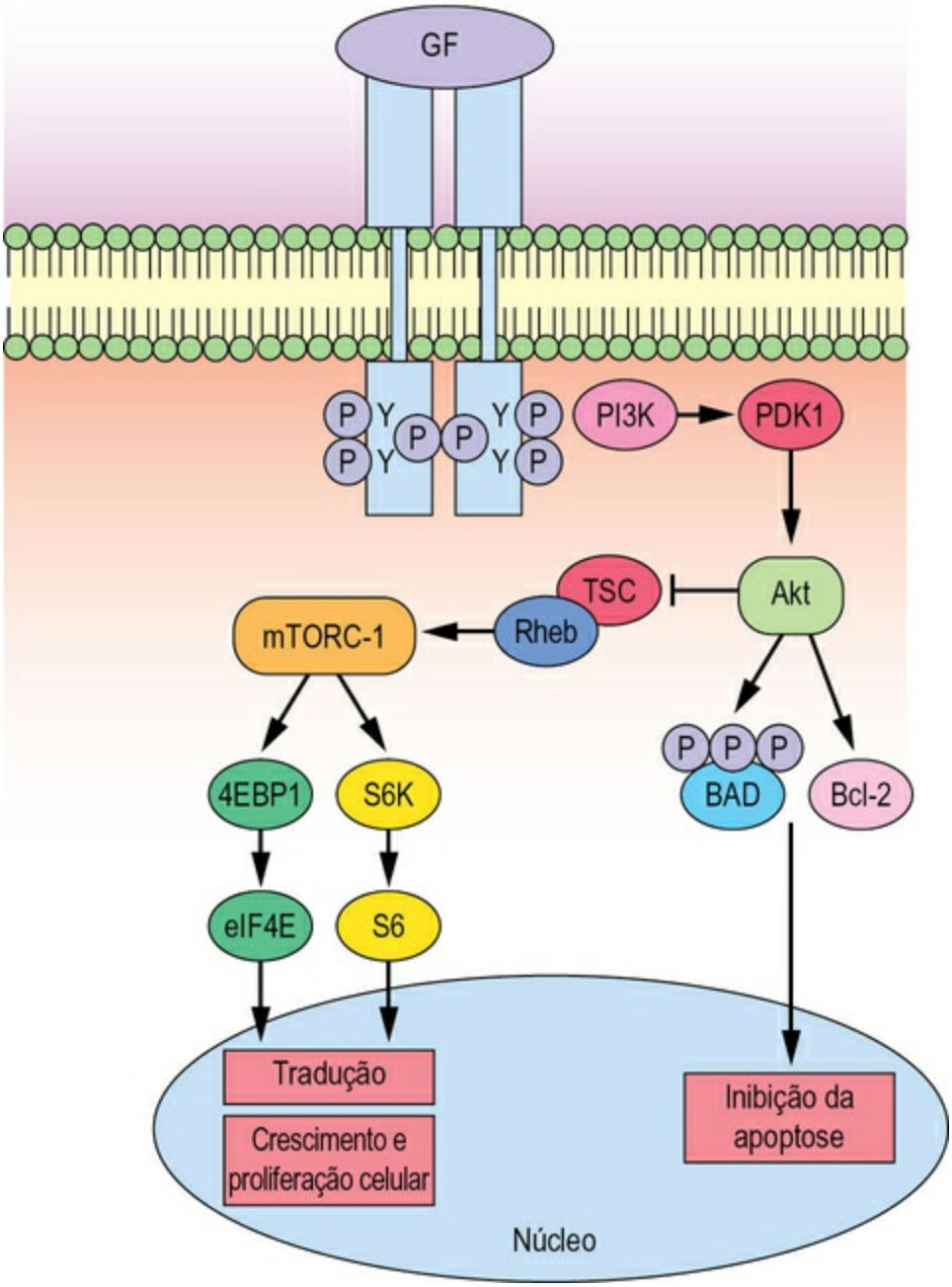


FIG. 42.5 Estimulação da sinalização mTOR por fatores de crescimento.
Sinais de fator de crescimento ativados na membrana plasmática como resultado da ligação do ligando podem resultar no recrutamento de PI3K, ativando assim a PDK1/AKT. Esta promove a síntese de proteínas por meio do mTOR (a subunidade catalítica do complexo proteico mTORC-1 ilustrado), contribuindo com isso para a progressão no ciclo celular e para a inibição da apoptose ao aumentar a expressão de ciclinas e de membros da família antiapoptótica Bcl-2. Além disso, a Akt inibe a apoptose ao mediar a hiperfosforilação da pró-apoptótica BAD, levando à estabilização da mitocôndria. GF, fator de crescimento; PI3K, fosfatidilinositol 3-cinase; mTOR, alvo da rapamicina em mamíferos; BAD, promotor de morte associado à Bcl-2; TSC, fator da esclerose tuberosa; Rheb, homólogo da *Ras* enriquecido no cérebro.

Apesar de as vias de sinalização anteriormente descritas serem lineares, ocorre uma quantidade significativa de conversa cruzada entre os elementos das cascatas

Por exemplo, a cascata de sinalização ERK-MAPK é capaz de regular o mTORC-1 ao ativar a cinase RSK1 que, por sua vez, fosforila e inibe a TSC1/2, resultando, assim, na ativação do mTORC-1. Exemplos como este ilustram a complexidade existente nas vias de sinalização intracelular a jusante dos receptores. Além disso, a conversa cruzada serve,

de certa forma, para realçar como uma mutação em um único componente de sinalização pode ter impacto em um vasto conjunto de respostas biológicas dentro de uma única célula.

Sinalização do receptor de citocinas

As citocinas são fatores de crescimento que coordenam principalmente o desenvolvimento de células hematopoiéticas e a resposta imune, apesar de terem também múltiplos efeitos em tipos celulares não hematopoiéticos

Como descrito anteriormente para os fatores de crescimento, as citocinas também exercem os seus efeitos nas células ao ligarem-se a receptores de superfície celular. Existem várias classes de receptores de citocinas, muitas das quais pertencem a uma superfamília chamada **receptores hematopoiéticos.** Estes são receptores transmembranares glicoproteicos, caracterizados pelos domínios extracelulares de ligação aos ligandos conservados, que contêm pares de cisteína característicos e um motivo pentapeptídio WSXWS (triptofano-serina-X-triptofano-serina, em que X é qualquer aminoácido). Muitos desses receptores consistem em subunidades múltiplas, contendo uma subunidade única de ligação ao ligando que lhes conferem especificidade, e uma subunidade comum transdutora de sinal que é frequentemente partilhada por várias citocinas relacionadas. A partilha da subunidade transdutora de sinal é a base para a classificação das citocinas em diferentes subfamílias e ajuda a explicar a imunodeficiência grave que resulta dos defeitos que ocorrem naturalmente nesses receptores.

As Janus cinases (JAKs) ligam os receptores hematopoiéticos à sinalização a jusante e à transcrição gênica

Ao contrário dos receptores de fatores de crescimento, os receptores de citocinas não possuem atividade catalítica intrínseca. No entanto, uma família de PTKs citosólicas, chamada Janus cinases (JAKs), é essencial para a conexão dos receptores hematopoiéticos com a sinalização a jusante e a transcrição gênica. Assim, após a interação do ligando com o receptor, a atividade tirosina cinase é induzida, e a maioria das citocinas, tal como os fatores de crescimento clássicos, pode sinalizar por meio das cascatas de sinalização da PLC, PI3K e Ras-MAPK. As JAKs se associam aos receptores ligando-se às regiões conservadas próximo do domínio transmembranar. Quando da ligação da citocina, que causa a oligomerização do receptor, as JAKs são fosforiladas e ativadas para mediar a fosforilação de seus alvos a jusante, os fatores de transcrição chamados transdutores e ativadores de sinal (STATs) (Fig. 42.6). Em células não estimuladas, os STATs se encontram no citoplasma na forma monomérica. A estimulação por citocinas leva à fosforilação dos STATs mediada pelas JAKs e à sua dimerização. Os dímeros de STAT são, depois, translocados para o núcleo onde medeiam a transcrição de genes-alvo ao ligarem-se às suas sequências específicas de DNA. Recentemente foi demonstrado que fatores de crescimento, como o EGF e o PDGF, também induzem a

ativação das vias JAK/STAT; desta forma, a sinalização JAK/STAT pode ser um mecanismo universal utilizado pelos fatores de crescimento para regular a indução de genes e as respostas celulares.

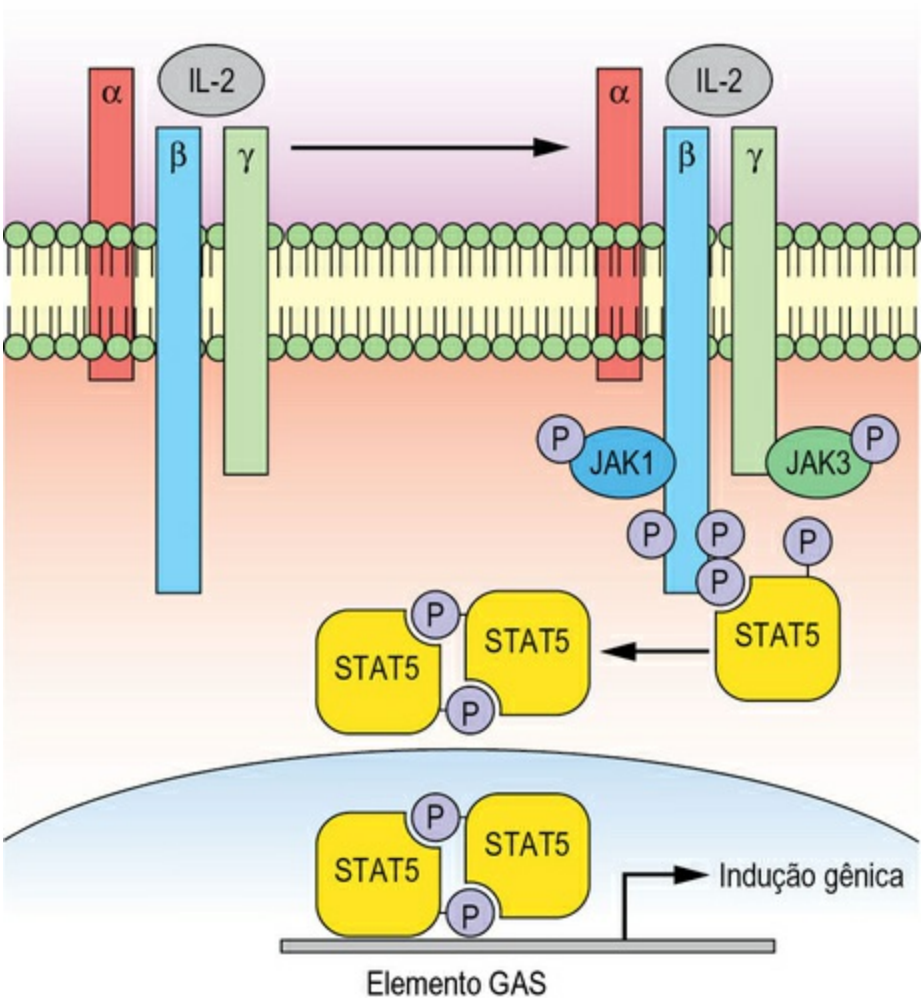


FIG. 42.6 Sinalização do receptor de citocina: o receptor da IL-2.
O receptor é composto pela cadeia α do receptor da IL-2 (IL-2Rα), pela IL-2/15Rβ e pela cadeia comum do receptor de citocina γ (γc). A ligação da IL-2 à subunidade α causa a associação dessa subunidade às subunidades β e γ, formando um heterotrímero estável. As moléculas JAK se associam às subunidades β (JAK1) e γc (JAK3), fosforilam-se a si próprias e aos resíduos de tirosina-chave nos domínios intracelulares β e γc, permitindo o recrutamento e a fosforilação de moléculas STAT5. As moléculas STAT5 fosforiladas se dissociam dos receptores e formam dímeros que rapidamente são translocados para o núcleo onde atuam como fatores de transcrição, ligando-se a elementos GAS. Diferentes JAKs e STATs podem ser utilizados para atingir a resposta específica de citocinas individuais. Estas vias controlam a transcrição, o crescimento, a proliferação e a sobrevivência celular. JAK, Janus cinase; STAT, transdutor de sinal e ativador da transcrição; GAS, sítio de ativação do interferon-gama.

Regulação do ciclo celular

A família de cinases serina/treonina, chamadas cinases dependentes de ciclinas (CDK), e as ciclinas, regulam os pontos de transição do ciclo celular

À medida que as células progridem ao longo do ciclo celular em resposta à estimulação

por fatores de crescimento, têm de passar por três pontos de transição/restrição semelhantes a um interruptor, posicionados no limiar das fases G1/S e na entrada e saída da fase M. Os principais reguladores desses pontos de transição incluem membros de uma família de cinases serina/treonina, chamadas cinases dependentes de ciclinas (CDK), e de uma família de proteínas, conhecidas como ciclinas.

As CDKs são expressas como heterodímeros contendo uma subunidade proteína cinase e uma subunidade reguladora de ciclina. Sua atividade é fortemente regulada por diferentes mecanismos, incluindo o estado de fosforilação da subunidade cinase, os níveis de ciclinas e/ou a interação com proteínas inibidoras (CDKIs) que bloqueiam sua atividade catalítica. Enquanto os níveis de expressão de CDK são relativamente constantes ao longo do ciclo celular, os níveis de expressão de ciclinas são rigorosamente controlados quer ao nível do mRNA, quer ao nível da proteína (controle transcricional e traducional). De fato, as ciclinas foram originalmente definidas como proteínas que eram especificamente degradadas durante cada mitose.



Quadro clínico

X-SCID: Deficiência na cadeia gama comum da interleucina

A imunodeficiência combinada grave (SCID) é um grupo de doenças congênitas herdadas raras, por vezes fatais, caracterizadas por pouca ou nenhuma resposta imunitária. Os pacientes com SCID partilham a característica comum do bloqueio no desenvolvimento das células T, associado a um comprometimento variável na imunidade B/NK dependendo da mutação que ocorreu (Cap. 38). Sem um sistema imune funcional, os pacientes com SCID estão suscetíveis a infecções recorrentes, como pneumonia, meningite e catapora, e podem morrer antes do primeiro ano de vida. Apesar de invasivos, os novos tratamentos, como o transplante de medula óssea ou de células estaminais, salvam até cerca de 80% dos pacientes com SCID.

Comentário

Cerca de 60% dos pacientes com SCID têm sinalização por meio de citocinas defeituosas. O gene responsável pela SCID foi inicialmente reportado como codificador da cadeia γ do receptor da IL-2. Atualmente sabe-se que a cadeia γ é uma **subunidade de sinalização comum partilhada** entre os receptores da IL-4, IL-7, IL-9, IL-13 e IL-15, o que justifica a existência de uma imunodeficiência tão grave, uma vez que o paciente é incapaz de responder a qualquer uma destas citocinas. A mutação é recessiva, pelo que as mulheres heterozigotas são portadoras normais, enquanto os homens que herdam o cromossomo X defeituoso desenvolvem a doença, daí ser referida como X-SCID. O domínio intracelular destas proteínas se associa normalmente à PTK e à JAK3, cuja ativação leva à indução de genes e ao crescimento e proliferação celular. Desta forma, mutações na JAK3 que levem à ausência ou defeito em sua função são a causa de uma forma autossômica recessiva de SCID e resultam em um fenótipo semelhante ao da X-SCID.

Apesar de o tratamento desta grave doença poder ser feito por transplante de medula óssea, a terapia genética tem sido testada como uma opção para restaurar o sistema imunitário com a introdução de precursores de células B e T derivadas da medula óssea do próprio paciente. Nestas células, o defeito na cadeia γ foi reparado pela terapia genética mediada por um vírus, tornando-as responsivas às citocinas e permitindo assim a reconstituição da resposta imune adaptativa. A descoberta de que mutações no JAK3 resultavam também em SCID sugeriram que o JAK3 poderá ser um bom alvo terapêutico para o desenvolvimento de novos imunossupressores. De fato, o inibidor da JAK3, o tofacinib, é usado como imunossupressor para prevenir a **rejeição de órgãos transplantados** bem como em doenças autoimunes, como a **psoríase, a artrite psoriática, a doença inflamatória intestinal e a artrite reumatoide.** Além disso, os inibidores da JAK3 são potenciais **terapêuticas antitumorais** para cânceres em que tenha sido demonstrado o aumento da atividade da JAK3, como a **leucemia mieloide aguda (LMA) e os cânceres colorretal e de pulmão.**

O modelo tradicional do ciclo celular estipula que uma associação ciclina-CDK específica dirige partes distintas do ciclo celular: as ciclinas tipo D e a CDK4/6 regulam os eventos na fase G1 precoce, a ciclina E-CDK2 desencadeia a fase S, a ciclina A-CDK2 e a ciclina A-CDK1 regulam a conclusão da fase S, enquanto a ciclina B-CDK1 controla a mitose (Fig. 42.7).

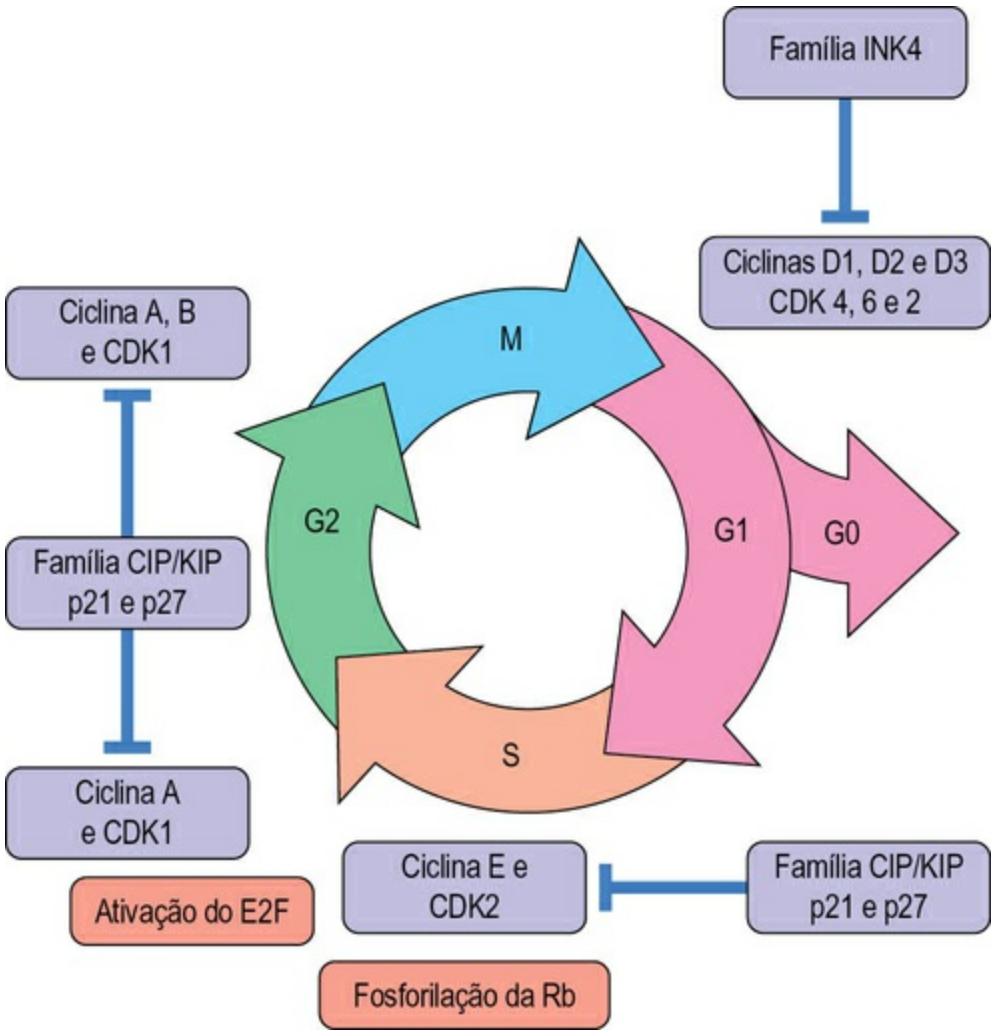


FIG. 42.7 Regulação do ciclo celular.
A progressão por meio do ciclo celular é regulada pela interação entre associações específicas ciclina-CDK e seus inibidores. A expressão de ciclinas, particularmente daquelas que controlam as fases G1 e S, é regulada por sinalização de fatores de crescimento. Membros da família INK4 inibem CDKs específicas da ciclina D (CDK4 e 6), enquanto a família CIP/KIP inibe todas as CDKs. CDK, cinase dependente de ciclina; CDKI, inibidor de CDK; E2F, fator de transcrição; Rb, proteína do retinoblastoma; INK4, inibidores da família CDK4.

Mitogênese

Sinais mitogênicos ativados por fatores de crescimento exercem seus efeitos entre o início da fase G1 e um ponto tardio na fase G1 chamado ponto de restrição

O evento-chave para a iniciação do ciclo celular na fase G1 é a fosforilação, em vários resíduos, da **proteína do retinoblastoma,** Rb. A Rb controla a expressão de genes que comprometem as células que chegaram ao ponto de restrição no final da fase G1 a entrar na fase S (síntese de DNA) do ciclo celular. No início da fase G1, as moléculas de Rb estão no estado hipofosforilado. Isso lhes permite ligar e reprimir a atividade de ligação ao DNA dos principais reguladores da transição entre as fases G1/S, membros da família E2F dos fatores de transcrição, inibindo assim a progressão no ciclo celular (Fig. 42.7). Outras moléculas que desempenham um papel importante nesta fase são as histona desacetilases e os complexos de remodelação da cromatina que regulam epigeneticamente a transcrição de genes. A estimulação com fatores de crescimento e/ou

mitógenos afeta a entrada no ciclo celular ao desencadear a expressão e/ou ativação de proto-oncogenes, como o *Ras e Myc,* o que resulta na indução da expressão de ciclinas da família do tipo D (D1, D2 e/ou D3), seguidas pelas ciclinas da família do tipo E (E1 e E2). As ciclinas do tipo D associam-se à CDK4/6 e estimulam sua atividade, enquanto as ciclinas do tipo E aumentam a atividade cinase da CDK2. Essas associações ciclina-CDK modulam o estado de fosforilação da Rb ao convertê-la do estado hipofosforilado para o hiperfosforilado, inativando assim a Rb e promovendo a liberação do E2F do complexo inibitório da Rb. As proteínas E2F livres medeiam a transcrição de genes, cujos produtos são importantes para a entrada na fase S e mais além, como as ciclinas dos tipos A e B (Fig. 42.7). A partir deste ponto para a frente, a progressão no ciclo celular é independente de fatores de crescimento.

Quadro de conceitos avançados

Mudando o paradigma clássico do ciclo celular

Estudos pioneiros que avaliavam as células em diferentes fases do ciclo celular, usando abordagens bioquímicas clássicas, como a sobre-expressão de cinases mutantes CDK de morte e inibidores farmacológicos seletivos das CDK, revelaram as associações ciclina-CDK preferenciais, levando à formulação do modelo tradicional do ciclo celular. No entanto, resultados de estudos genéticos recentes, envolvendo deleções específicas de ciclinas e CDKs em ratos e leveduras, demostraram que este modelo deve ser revisto.

Curiosamente, os embriões de ratos são viáveis mesmo na ausência de CDK2, CDK4 e CDK6, indicando que essas CDKs têm funções redundantes e são dispensáveis para controlar a proliferação celular. A ausência das CDKs, no entanto, afeta a proliferação e/ou diferenciação de alguns tipos celulares específicos. Ratos *knockout* para CDK2 sobrevivem até os dois anos de idade, mas são estéreis, indicando que a CDK2 é absolutamente necessária para a meiose.

Além disso, a CDK4 controla a proliferação/diferenciação das células β pancreáticas ou das células produtoras de hormônio pituitário, enquanto a CDK6 regula a proliferação/diferenciação de algumas células hematopoiéticas. Por outro lado, a CDK1 é essencial para dirigir o ciclo celular na maioria dos tipos celulares, pelo menos até meio do caminho da gestação.

A partir desses estudos, emergiu um novo modelo conhecido como **modelo do limiar mínimo.** Neste modelo, tanto a CDK1 quanto a CDK2 associadas à ciclina A ou E são suficientes para controlar a interfase, enquanto a CDK1 associada à ciclina B dirige as células para a mitose. As diferenças na atividade dos mesmos complexos ciclina-CDK na interfase e na mitose podem ser atribuídas não apenas à especificidade de substrato, mas também à diferente localização no interior da célula e a um limiar de atividade superior para a mitose em relação à interfase. Além de ser regulada pela ligação de ciclinas, a ativação das CDK é também modulada por fosforilação. O complexo de ativação de CDKs (CAK), composto pela CDK7, pela ciclina H e pela

MAT1 *(ménage a trois)*, medeia a fosforilação/ativação da CDK1, CDK2, CDK4 e CDK6, quando ligado aos seus parceiros de ciclina. Além disso, o CAK desempenha um papel na transcrição de genes como parte do TFIIH, que é um fator de transcrição geral. Nesse contexto, o CAK fosforila o domínio *C*-terminal (CTD) da subunidade grande da RNA polimerase II. Esse evento faz parte do processo de remoção do promotor e de progressão da fase de pré-iniciação para a fase de iniciação da transcrição.

Quando as ciclinas do tipo E são degradadas, a CDK2 se liga às ciclinas do tipo A, e estes complexos fosforilam várias proteínas-alvo necessárias para a conclusão e saída adequada da fase S. No final da fase S, as ciclinas do tipo A se associam também à CDK1, e estes complexos partilham substratos com o complexo ciclina A-CDK2. A importância da existência de ambos os complexos, ciclina A-CDK1 e ciclina A-CDK2, não é ainda clara.

Ainda assim, durante a fase G2, as ciclinas do tipo A são degradadas por proteólise mediada por ubiquitina, e ciclinas do tipo B são sintetizadas e interagem com a CDK1. Estima-se que os complexos ciclina B-CDK1 fosforilem mais de 70 proteínas-alvo, que são mediadores importantes de processos regulatórios e estruturais (condensação cromossomal, fragmentação da rede de Golgi e quebra do invólucro nuclear) durante a transição G2/M. Por fim, a inativação dos complexos cilcina B-CDK1 é necessária para a saída da mitose. Isso é alcançado pela marcação com ubiquitina e subsequente degradação proteassomal das ciclinas do tipo B regulada pelo complexo promotor da anáfase (APC). A principal fosfatase que medeia o regresso à interfase após a mitose é uma forma de proteína fosfatase-2A (PP2A), cuja atividade é aumentada após a degradação das ciclinas mitóticas.

Monitorização de danos no DNA

Os pontos de controle moleculares que medeiam a progressão adequada ao longo do ciclo celular são sensíveis a problemas que possam ocorrer durante a síntese de DNA e a segregação de cromossomos

O derradeiro papel desses pontos de controle é inibir a atividade dos complexos ciclina-CDK e, assim, atrasar ou parar a divisão celular. Durante a replicação, o DNA está menos condensado e, portanto, menos protegido do ataque de agentes genotóxicos exógenos e endógenos que podem causar danos no DNA.

No caso de ocorrerem danos, os pontos de controle de danos no DNA são sensíveis a alterações e ativam vias de sinalização que medeiam a reparação de DNA

Se o dano é irreparável, os pontos de controle induzem apoptose. As moléculas nucleares do ponto de controle de danos no DNA são as **cinases sensoras,** a proteína mutada ataxia-telangiectasia (ATM) e a proteína ataxia-telangiectasia relacionada com o Rad3 (ATR), que detectam quebras na cadeia dupla e estresse replicativo, respectivamente, e as **cinases de ponto de controle,** a CHK1 e a CHK2, que dependem dos sinais das cinases

sensoras. Essas moléculas evitam as transições entre as fases G1/S e G2/M, inibindo a atividade das CDK ao aumentar a expressão de proteína inibidora das CDK (CDKI) p21, por meio da estabilização da p53 e/ou da inibição das fosfatase Cdc25, os ativadores das CDK.

A proteína supressora tumoral p53 é predominantemente uma proteína sensível aos danos no DNA e que os monitora ao longo do ciclo celular

Se são detectados danos no DNA, a ATM e subsequentemente a CHK2 cinase são ativadas, ação esta que contribui para a estabilização da p53 de modo que, assim, permita a indução de mecanismos de reparação do DNA. Um dos papéis da **p53** é atuar como um fator de transcrição, aumentando a expressão de CDKI p21 (WAF1). Por sua vez, a p21 inibe os complexos ciclina D-CDK4, evitando a fosforilação da Rb e, desta forma, promovendo a ligação Rb/E2F e a supressão da transcrição de genes mediada pelo E2F. Além disso, os complexos ciclina do tipo E-CDK2 são inibidos, permitindo a interrupção no ciclo celular na transição G1/S. Isso proporciona tempo à célula para a reparação dos danos no DNA e, assim, previne a incorporação de material genético mutado nas células filhas. No entanto, se os danos no DNA forem irreparáveis, é desencadeada a morte celular programada por **apoptose** dependente da p53.

Uma via independente da p53 envolvendo a família de proteínas INK4 pode também induzir a interrupção do ciclo celular na fase G1 em resposta a danos no DNA

Estas proteínas, que incluem a p16 (INK4A), a p15 (INK4B), a p18 (INK4C) e a p19 (INK4D), medeiam a interrupção do ciclo celular ao ligarem-se à CDK4/6 ou ao seu parceiro de ligação, a ciclina D, causando a inativação dos complexos ciclina D-CDK4/6. Outro ponto de controle importante é o ponto de encontro do fuso mitótico (SAC), que assegura o alinhamento e a segregação adequados dos cromossomos na metáfase da mitose. O sinal SAC é gerado pela presença de cinetócoros (complexos de proteínas nas cromátides que medeiam a ligação ao fuso mitótico) livres ou indevidamente ligados, que leva, em última instância, à inibição do complexo promotor da anáfase (APC), previnindo, portanto, seu início.

Os defeitos nos pontos de controle de danos no DNA permitem a acumulação de alterações no material genético, contribuindo para a **instabilidade genômica,** enquanto um SAC defeituoso pode levar a uma segregação desigual do material genético para as células filhas, criando **aberrações cromossômicas.** Tanto a instabilidade genômica quanto as aberrações cromossômicas são culpadas na transformação celular e oncogênese.

Morte celular

A morte celular é uma parte fundamentalmente importante do ciclo de vida celular, e a regulação apropriada deste processo é crítica para manter a regulação homeostática de um organismo multicelular

A morte celular pode ser acidental ou programada, sendo iniciada e executada por meio

de vias bioquímicas distintas. A **morte celular programada (PCD)** é geneticamente regulada, e seu papel é remover células desnecessárias, danificadas ou mutadas. Durante vários anos, apoptose era sinônimo de PCD; no entanto, esse conceito está mudando devido aos recentes achados que identificaram diferentes modos de morte celular controlada.



Quadro clínico

Ataxia telangiectasia

A ataxia telangiectasia é uma doença autossômica recessiva rara causada por mutações no gene mutado da ataxia telangiectasia (ATM). Os pacientes que sofrem desta doença têm os seguintes sintomas e sinais: intestino instável, telangiectasia, pigmentação cutânea, infertilidade, deficiências imunes e incidência aumentada de câncer, especialmente de tumores linforreticulares.

Comentário

A ATM é uma proteína cinase serina/treonina envolvida na indução do ponto de controle de danos no DNA em resposta à radiação ionizante, a tratamentos anticancerígenos ou a quebras programadas no DNA durante a meiose. As células na ataxia telangiectasia exibem instabilidade cromossomal, hipersensibilidade a reagentes que induzam quebras na cadeia de DNA e defeitos nas fases G1/G2, e regulação alterada da expressão de p53 e p21. A ATM é constitutivamente expressa durante o ciclo celular e está envolvida na indução da paragem do ciclo celular e/ou na apoptose mediada pela p53. Na ataxia telangiectasia, as células com ATM mutada são incapazes de ativar adequadamente a p53 e assim incapazes de induzir a interrupção do ciclo celular ou a apoptose em resposta à radiação ionizante. Além disso, quando a p53 está também mutada, o ciclo celular não é adequadamente regulado, o que aumenta o risco de formação de tumores como resultado da acumulação de mutações.

Tanto a iniciação quanto a execução da morte celular são processos complexos; os cientistas usam as características morfológicas e/ou bioquímicas como os critérios mais comuns para classificar as várias formas de morte celular. De acordo com os critérios morfológicos, a morte celular pode ser classificada como:

- **Apoptose:** arredondamento da célula, retração dos pseudópodes, redução dos volumes celular e nuclear (picnose), condensação e fragmentação da cromatina (cariorrexe), aparecimento de bolhas na membrana plasmática, formação de corpos apoptóticos e ingestão por fagócitos residentes *in vivo*.
- **Autofagia** (frequentemente referida como morte celular autofágica): vacuolização massiva do citoplasma, acumulação de vacúolos autofágicos de membrana dupla, sem condensação da cromatina e pouca ou nenhuma ingestão por fagócitos *in vivo*.
- **Necrose** ou morte celular necrótica: aumento do volume celular, dilatação das organelas celulares e explosão da membrana plasmática com perda concomitante do

conteúdo intracelular. A necrose é frequentemente considerada uma forma acidental e incontrolável de morte celular que ocorre após lesão grave da célula. No entanto, investigações recentes demonstraram que a necrose pode ser controlada e iniciada por intermédio de vias de sinalização específicas envolvendo principalmente a cinase serina/treonina RIP1. Esse tipo de necrose é chamada PCD tipo-necrose ou necroptose e foi observada em células cancerígenas, células em proliferação que sofreram danos no DNA, bem como em células infectadas com determinados vírus (como vírus Vaccinia).

- **Cornificação** (também conhecida como formação do "invólucro cornificado" ou queratinização): uma forma específica de PCD da epiderme, cujo papel é criar uma barreira entre o organismo e o ambiente. Esse processo é caracterizado pela eliminação das organelas citosólicas, modificações na membrana plasmática, acumulação de lipídios e proteínas específicas no interior e exterior das células para criar elasticidade na pele, resistência mecânica e resistência à água.

Apoptose

A apoptose é iniciada e executada por meio da perturbação da homeostasia intracelular pelas vias intrínseca (mitocondrial) e extrínseca, a última das quais envolvendo a ligação de receptores de morte, como o FAS, o TNFR, o TRAIL e o TWEAK

Para ambos os processos, duas famílias de proteínas são consideradas reguladores principais: proteases de cisteína chamadas caspases, e os membros da família relacionada com a proteína 2 do linfoma de células B (Bcl-2), que interagem para servir de moduladores de decisões de vida *versus* morte (Fig. 42.8). No entanto, existe crescente evidência para outras vias de PCD que são sensíveis a estresse e danos em outras organelas celulares (como o retículo endoplasmático e os lisossomos) e resultam na iniciação de programas de morte. Esses programas podem ocorrer em associação com ou independentemente da via mitocondrial intrínseca.

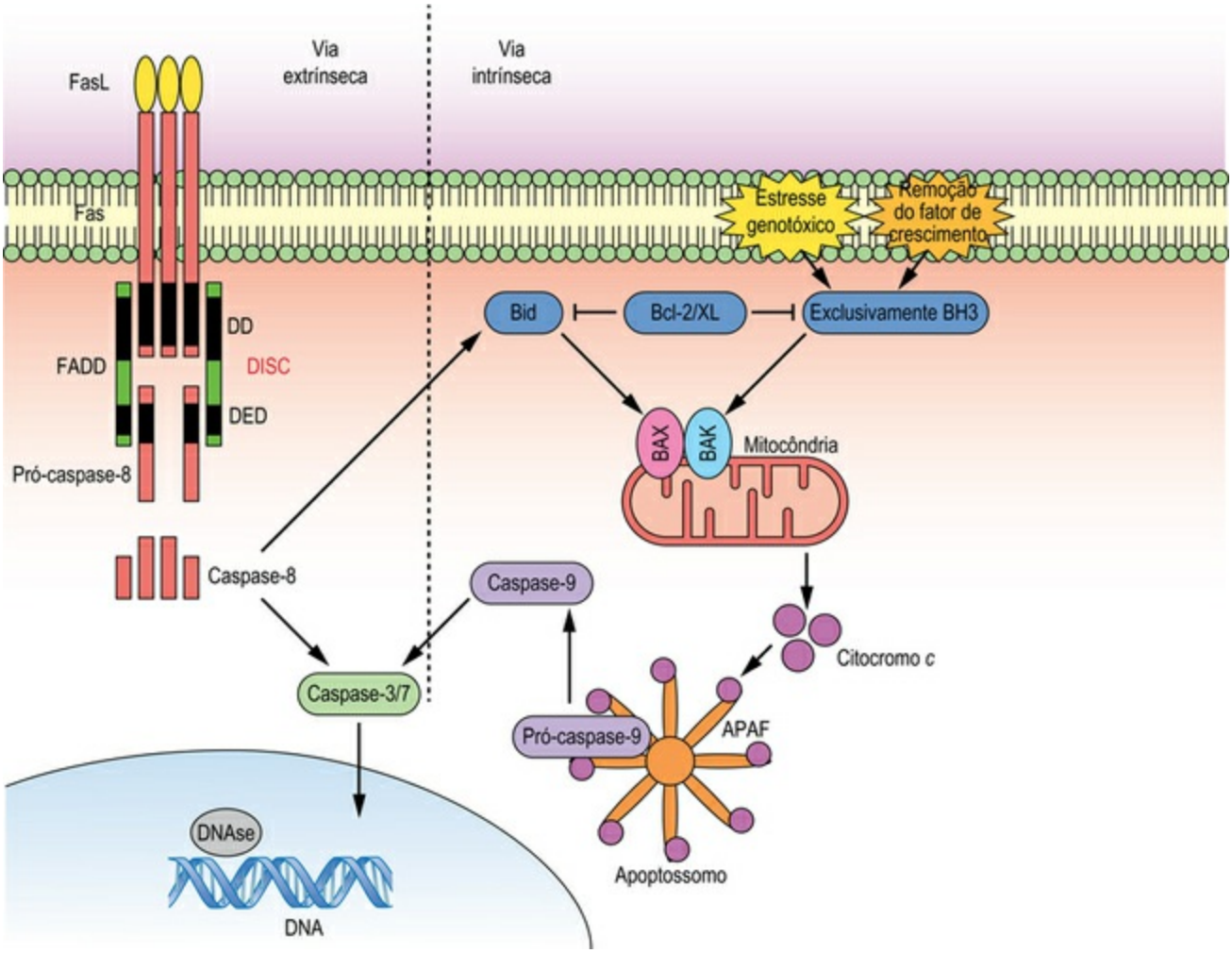


FIG. 42.8 Regulação da apoptose.
Dois principais modos de apoptose são induzidos pela ligação de receptores de morte, como o Fas, por privação de fatores de crescimento ou por estresse genotóxico. A ligação ao receptor Fas induz a via extrínseca de morte celular: a principal caspase iniciadora é a caspase-8. A ligação do FasL causa a trimerização do receptor e a formação de uma estrutura macromolecular chamada DISC, que atua como uma plataforma para a ativação da caspase-8. Quando ativada, a caspase-8 pode clivar diretamente e ativar a caspase-3 efetora ou pode clivar a proteína exclusivamente de BH3 Bid, que atua de modo direto na mitocôndria, alimentando assim a segunda via de morte celular conhecida como via intrínseca. Esta via é iniciada pela regulação positiva ou ativação de membros da família exclusivamente de BH3, que libertam a inibição mediada pela Bcl-2/xL, permitindo a formação do poro Bax/Bak na membrana externa mitocondrial. Este poro causa a fuga de citocromo *c* para o citoplasma, onde forma o apoptossomo com a APAF-1 e a pró-caspase-9. O apoptossomo é uma plataforma para a ativação da caspase-9 que, quando clivada, adota uma conformação ativa e pode clivar a caspase-3 efetora. A caspase-3 ativa medeia, então, a proteólise em massa ao ativar outras hidrolases ou clivando diretamente componentes estruturais. DISC, complexo de sinalização indutor de morte; Bid, agonista de morte de interação com o domínio BH3; Bax, proteína X associada à Bcl-2; Bak, antagonista/*killer* homóloga da Bcl-2; APAF-1, fator de ativação da protease apoptótica 1; FADD, proteína de domínio de morte associada à FAS; DD, domínio de morte; DED, domínio efetor de morte.

Caspases

As caspases são proteases de cisteína com especificidade para o substrato aspartato

As caspases são sintetizadas como proenzimas inativas (zimogênios) referidas como pró-

caspases. De acordo com seu papel nas vias de morte, as caspases podem ser classificadas como caspases iniciadoras ou efetoras.

As **caspases iniciadoras** (caspase-2, -8, -9, -10) são sintetizadas como monômeros e, após a recepção de um sinal de morte pela célula, sofrem ativação resultante de alterações conformacionais induzidas por proximidade e dimerização dentro de complexos multiméricos, bem como clivagem autoproteolítica, que induz à atividade enzimática completa. Uma vez ativadas/clivadas, as caspases medeiam a clivagem proteolítica de outras caspases na via de morte.

As **proenzimas caspases efetoras** são expressas como dímeros pré-formados que são ativados pelo ataque proteolítico direto de caspases ativadoras. Esses efetores executam depois o programa de morte cerebral por meio da clivagem de várias proteínas celulares vitais (como as lamininas ou a gelsolina), induzindo interrupção do ciclo celular e incapacitando a iniciação de mecanismos homeostáticos e de reparação. Todos estes eventos levam à separação da célula do tecido circundante, desmantelando componentes estruturais e, em última instância, à demonstração do sinal de ingestão fosfatidilserina (PS) para fagocitose. A sobre-expressão de caspases ativas é suficiente para induzir apoptose celular.

A família de genes IAP: sua principal função é inibir a apoptose

A família de genes inibidores da apoptose (IAP), composta por nove membros da família (IAP ligada ao X, cIAP1, cIAP2, IAP do melanoma, proteína tipo-IAP, proteína inibidora da apoptose neuronal, survivina, livina e apollon) é evolucionalmente conservada desde a *Drosophila* até os humanos. A principal função desta família de genes é, tal como o nome indica, inibir a apoptose bloqueando diretamente caspases e/ou ativando vias de sobrevivência por meio da função do NFκB. Por exemplo, a IAP ligada ao X inibe as caspases -3, -7 e -9 por ligação direta ao sítio ativo das caspases -3 e -7, enquanto no caso da caspase-9 previne a dimerização necessária para a total ativação. Por outro lado, a cIAP1 e a cIAP2 são reguladores positivos tanto da via canônica quanto da via não canônica da ativação do NFκB. A survivina, além de inibir a apoptose, desempenha um papel na progressão no ciclo celular ao bloquear a atividade da caspase-3, preservando, assim, a integridade da p21 no interior do complexo survivina-caspase-3-p21, e ao mediar a segregação apropriada dos cromossomos como parte do complexo que liga os cromossomos aos cinetócoros. Não é, portanto, surpreendente que se tenha descoberto que membros da família IAP contribuam para a sobrevivência de células tumorais, para a invasão celular e para as metástases em vários cânceres humanos. Curiosamente, a perda de cIAP1/cIAP2 está implicada no desenvolvimento de **mieloma múltiplo.**

A família de genes Bcl-2 é composta por proteínas relacionadas estruturalmente que formam homo- ou heterodímeros e atuam como reguladores positivos ou negativos da apoptose

O gene *Bcl-2* foi inicialmente descoberto em um linfoma folicular de células B como uma proteína constitutivamente expressa devido a uma translocação de cromossomos t(14;18), que colocou o gene *Bcl-2* sob o controle do promotor da cadeia pesada da

imunoglobulina. Os membros da família Bcl-2 têm sido tradicionalmente classificados em três grupos: os membros da família pró-sobrevivência (Bcl-2; Bcl-xL; Bcl-W; Mcl-1); da família pró-apoptótica BAX/BAK; e das proteínas exclusivamente BH3 pró-apoptóticas (BIM; BID; PUMA; NOXA; BAD; BIK). Enquanto a função da Bcl-2 aparenta a preservação da integridade da membrana mitocondrial externa, os membros pró-apoptóticos da família BAX e BAK são responsáveis por induzir a permeabilização da membrana mitocondrial externa e liberação subsequente de mediadores apoptóticos (como o citocromo *c*), levando à ativação de caspases. A Bcl-2 e a Bcl-xL previnem a indução da apoptose ao inibir a BAX e a BAK, ao passo que os membros da família exclusivamente BH3 previnem essa inibição por meio de uma ligação direta à Bcl-2 e a outros membros antiapoptóticos (Fig. 42.8).

Existem vias alternativas à apoptose

A ruptura de membranas lisossomais causa a liberação e ativação de proteases lisossomais (isto é, catepsinas), que medeiam a clivagem proteolítica direta de componentes celulares ou a ativação da via intrínseca. O estresse no retículo endoplasmático (ER) é geralmente causado pela acumulação de proteínas desdobradas no lúmen, dando origem à resposta a proteínas desdobradas ou fluxo intracelular irregular de Ca^{2+}. Estas perturbações usualmente induzem apoptose por meio da via intrínseca. A acumulação de agregados de proteínas desdobradas ou dobradas anormalmente está associada a várias doenças neurodegenerativas, incluindo a **doença de Alzheimer, doença de Huntington e doença de Parkinson.** Por exemplo, agregados de proteína-β-amiloide e mutações na presenilina 1 associada ao ER têm sido relacionados com o desenvolvimento de doença de Alzheimer familiar. Curiosamente, todas estas vias podem conversar cruzadamente e executar programas de morte complexos em ambos os sentidos, morfológico e bioquímico.

Autofagia

A autofagia é um processo de degradação de componentes celulares em que uma parte do citoplasma é ingerida por uma membrana específica e os conteúdos são subsequentemente degradados por enzimas lisossomais

A autofagia é um processo homeostático altamente regulado que desempenha um papel na remoção de proteínas de longa vida ou na eliminação de organelas danificadas, como a mitocôndria (mitofagia) ou o ER (reticulofagia). Além de estar associada à morte celular, a autofagia pode também permitir às células sobreviver a condições de jejum nas circunstâncias de disponibilidade diminuída de nutrientes intra- e extracelulares. Neste caso, a autofagia induz processos catabólicos que geram substratos metabólicos a partir de componentes "próprios", permitindo, assim, às células atingir suas necessidades energéticas e iniciar a chamada síntese adaptativa de proteínas em tempo de escassez.

Quadro de conceitos avançados

As vias de morte intrínseca e extrínseca

A via apoptótica extrínseca é incitada pela ativação de receptores de morte, como os membros da família do TNF (Fas, TNFR, TRAIL ou TWEAK). Por exemplo, a ligação do ligando homotrimérico FasL ao Fas causa a oligomerização do receptor e a montagem de um "complexo de sinalização indutor de morte" (DISC) intracelular. O DISC contém a pró-caspase-8, o seu domínio de morte adaptador/ativador associado ao Fas (FADD) e o seu modulador cFLIP. A ativação da caspase-8 ocorre primeiramente por mudança conformacional, que possibilita a total atividade enzimática, e depois por clivagem autoproteolítica da forma pró-caspase. As moléculas clivadas de caspase-8 deixam depois o DISC e ganham acesso aos alvos a jusante, que incluem caspases efetoras, como as caspases-3 e -7, ou agonistas de morte de domínio de interação com o BH3 (Bid) membros da família pró-apoptótica Bcl-2. O Bid clivado alimenta depois a via intrínseca para amplificar o sinal de morte.

A via apoptótica intrínseca é também referida como uma via regulada pela Bcl-2, devido à complexa interação entre os membros pró- e anti-apoptóticos da família Bcl-2, que determina o destino da célula. Esse complexo é geralmente ativado por sugestões do desenvolvimento, por infecções virais, por danos no DNA e por privação de fatores do crescimento ou outros insultos citotóxicos. Estas condições de estresse aumentam a expressão de membros da família exclusivamente BH3 ou, como alternativa, aumentam sua ativação pós-translacional, dependendo do contexto da indução de morte. Os membros da família pró-apoptótica Bcl-2 ativados liberam a inibição da proteína X associada ao Bcl-2 (BAX) e da proteína antagonista/*killer* homóloga da Bcl-2 (BAK) nos poros da membrana mitocondrial externa, permitindo a liberação de citocromo *c* do espaço intermembranar mitocondrial para o citoplasma. O citocromo *c* citoplasmático se liga depois ao fator 1 de ativação de protease apoptótica (APAF1), permitindo a formação de um apoptossomo que serve de plataforma para a ativação da caspase-9 (Fig. 42.8). A caspase-9 ativa cliva, posteriormente, a caspase-3 e/ou -7 que, por sua vez, medeia uma proteólise em massa de proteínas celulares vitais, ativa DNAses e orquestra a demolição da célula.

A autofagia é induzida por uma variedade de estímulos de estresse, incluindo estresse energético e de nutrientes, tais como hipoxia, estresse redox, infecções, estresse do ER e danos mitocondriais

Todos esses estresses induzem diferentes vias de sinalização que regulam a autofagia. Um evento de sinalização característico que induz a autofagia como resultado de privação de nutrientes é a inibição da sinalização do mTORC-1 e/ou da ativação da AMPK. O processo da autofagia envolve a formação de uma estrutura membranar, denominada fagóforo (provavelmente pela síntese *de novo*), que encerra parte do citoplasma ou a totalidade de uma organela, formando uma estrutura de membrana dupla chamada autofagossomo. Este pode, depois, fundir-se com um endossomo, criando um

ampissomo. Subsequentemente, essas estruturas fundem-se com um lisossomo, gerando um autolisossomo, no qual hidrolases ácidas quebram a membrana interna e o conteúdo. Os blocos de construção das macromoléculas digeridas são depois reciclados de volta ao citoplasma por intermédio de canais de proteínas denominados permeases (Figs. 42.9 e 42.10).

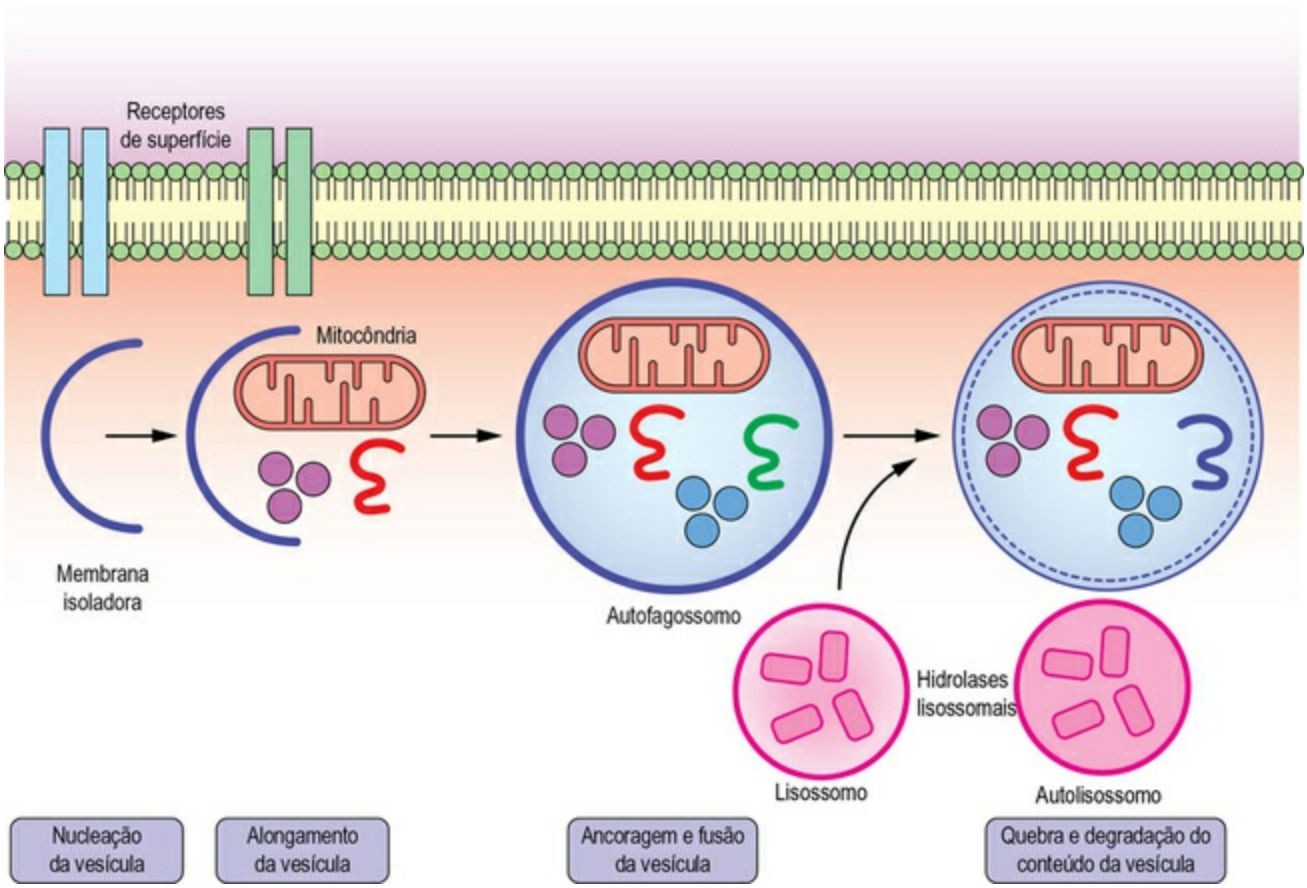


FIG. 42.9 Autofagia.
O processo de autofagia começa pela formação de uma membrana de isolamento (fagóforo) que ingere a mitocôndria danificada e/ou proteínas anormalmente dobradas e forma a vesícula de membrana dupla chamada autofagossomo (vacúolo autofágico). Os autofagossomos sofrem maturação e fundem-se com lisossomos, criando desta forma autolisossomos em que a membrana interna do autofagossomo e seu conteúdo luminal são degradados pela ação de hidrolases ácidas lisossomais, como as catepsinas.

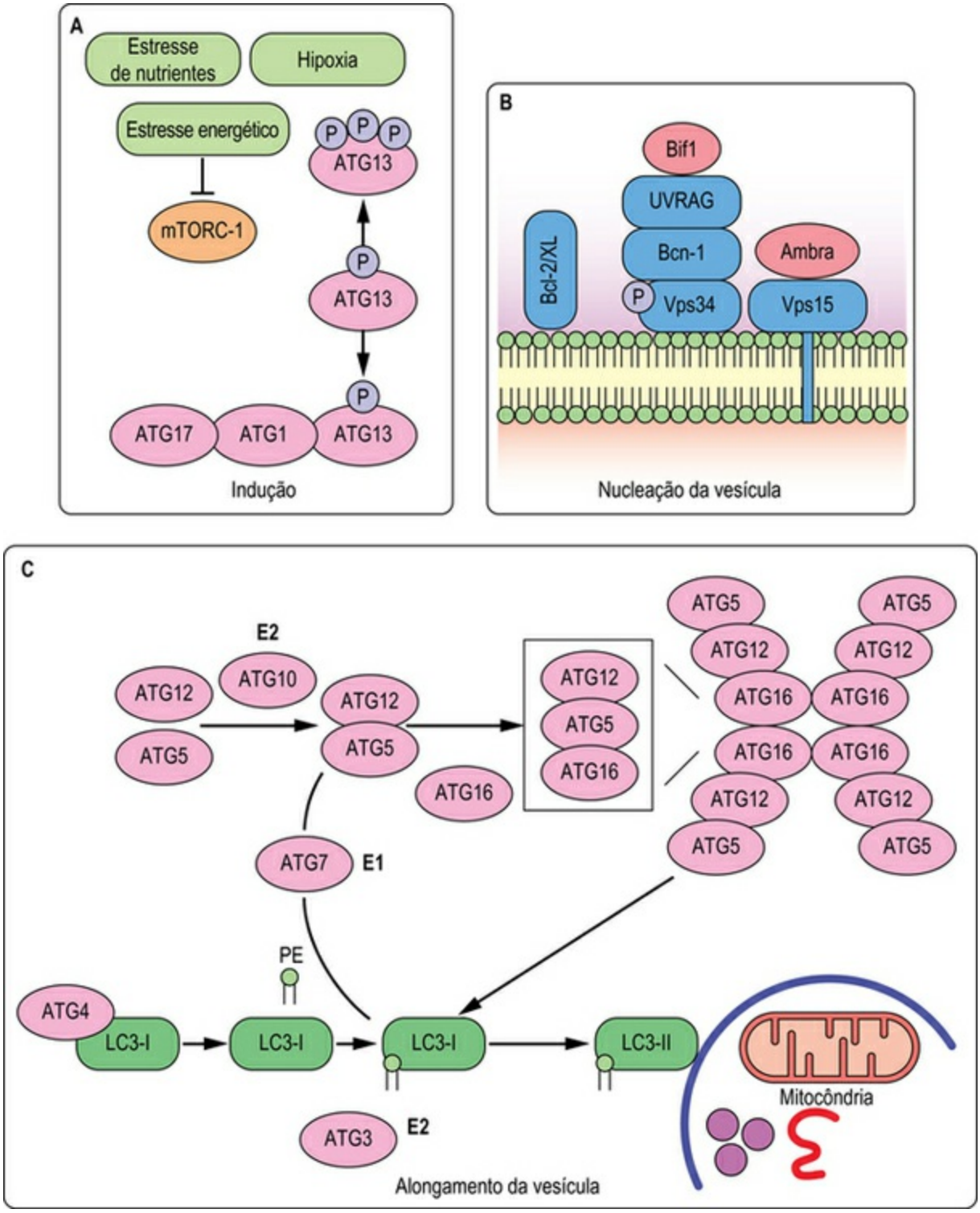


FIG. 42.10 Autofagia: moléculas importantes.
(A) A autofagia é geralmente induzida pela inibição da via do mTOR, que liberta a proteína ATG13 da fosforilação inibitória e permite sua associação com a ATG1. No interior do complexo ATG1-ATG13-ATG17, a atividade catalítica da ATG1 é aumentada e contribui para a indução da autofagia por um mecanismo ainda desconhecido. **(B)** A nucleação da vesícula é iniciada pela ativação da Vps34, uma PI3K de classe III de mamíferos, no interior de um complexo com a Bcn-1, a UVRAG e a cinase miristilada Vps15. A Vps34 ativada catalisa a formação do PIP3 necessário para a formação da membrana autofagossomal. **(C)** O alongamento da vesícula e a conclusão do autofagossomo são regulados pelos dois sistemas de conjugação do tipo ubiquitina: a LC3 (ATG8) e a ATG12. A fosfatidiletanolamina (PE) é conjugada com a LC3 em um processo faseado, controlado pela protease ATG4, pela enzima de tipo E1 ATG7 e pela enzima de tipo E2 ATG3. A ligação da PE ao LC3 converte este último (LC3-I) de uma forma solúvel para uma forma associada à membrana do autofagossomo (LC3-II). Esse processo de conversão é a base para vários métodos de detecção de autofagia. Na segunda via, a ATG12 é complexada com a ATG5 em um processo mediado pela **enzima de tipo E1 ATG7** e pela **enzima de tipo E2 ATG10.** O complexo ATG12-ATG5 forma, então, um complexo multimérico com a ATG16, que auxilia na marcação da LC3 para a membrana

autofagossomal e acelera a conjugação de lipídios. ATG, gene relacionado com a autofagia; PI3K, fosfatidilinositol 3-cinase; UVRAG, proteína do gene associado à resistência à radiação UV; LC3, proteína de cadeia leve associada aos microtúbulos 3. Para mais detalhes veja o Quadro de Conceitos Avançados na página seguinte.



Quadro clínico

A apoptose e autofagia desreguladas podem causar condições patológicas distintas

Apoptose desregulada

A apoptose excessiva está ligada a **doenças neurodegenerativas** e a **imunodeficiência,** enquanto a evasão à apoptose é um importante contribuinte para a **oncogênese** e para o desenvolvimento de **doenças autoimunes.** Mutações (deleções/adições de um ou de um pequeno número de nucleotídios nos éxons codificantes ou nos locais de *splice*) no receptor de morte Fas levam à falha na apoptose mediada pelo Fas, que leva à sobrevivência aumentada de linfócitos ativados causadores da **síndrome linfoproliferativa autoimune (ALPS).** Esta doença hereditária rara se apresenta usualmente no início da infância. Pacientes com ALPS têm linfoadenopatias, esplenomegalia e citopenias autoimunes e apresentam risco aumentado de desenvolvimento de linfomas. A expressão e função aberrantes de membros da família Bcl-2 estão também implicadas no desenvolvimento de doenças autoimunes e de câncer. A deleção do membro da família Bcl-2 Bim em ratos causa uma doença de tipo lúpus eritematoso sistêmico (tipo-LES), enquanto a translocação cromossomal do Bcl-2 para o *locus* da cadeia pesada da imunoglobulina (t[14;18]) resulta na expressão constitutiva da Bcl-2, levando ao desenvolvimento de linfoma folicular.

Autofagia desregulada

Perturbações na indução e execução da autofagia podem também levar a uma série de distúrbios e doenças. Deleções monoalélicas no gene *BECN1/ATG* são tumorigênicas em ratos, e uma diminuição na expressão de Beclina 1 é observada no **carcinoma de mama humano.** Mutações de perda de função nos genes Pink1 e Parkin, que são reguladores da mitofagia, estão ligadas à **doença de Parkinson familiar** em humanos. Semelhantes às doenças neurodegenerativas comuns são as **doenças de armazenamento lisossomal,** que incluem mais de 40 perturbações genéticas, sendo sua maioria ligadas à deficiência de hidrolases lisossomais. A função reduzida ou comprometida destas enzimas leva à acumulação de moléculas que de outra forma seriam degradadas, ao passo que as **doenças de Huntington** e de **Parkinson** estão associadas à acumulação de uma forma mutante da proteína α-sinucleína.

Além de seus papéis na manutenção da homeostasia celular, a autofagia desempenha um papel tanto na imunidade inata quanto na adaptativa. Por exemplo, a autofagia é usada para a eliminação de bactérias intracelulares, como o *Streptococcus pyogenes* e o

Mycobacterium tuberculosis. Além disso, o antígeno nuclear 1 do vírus Epstein-Barr (EBNA1) é processado por meio de uma via autofágica e descarregado em moléculas MHC classe II para apresentação aos linfócitos T $CD4^+$.

Câncer

As células que desenvolvem mutações afetando a normal regulação do ciclo celular são capazes de experimentar proliferação não controlada, resultando na perda da regulação homeostática e no desenvolvimento de um tumor ou neoplasma

Desde que as células tumorais permaneçam em um tumor intacto, este será considerado **benigno** e poderá ser removido cirurgicamente. No entanto, se mais mutações permitem que esse tumor invada e colonize outros tecidos, criando tumores secundários generalizados ou **metástases,** o tumor será descrito como **maligno** e classificado como **câncer.** Cada câncer é derivado de uma única célula que experimentou alguma mutação na linha germinal permitindo-lhe crescer excessivamente à volta das células a seu redor; no momento em que são detectados pela primeira vez, os tumores contêm tipicamente um bilhão de células. Os cânceres são classificados de acordo com o tipo de tecido e de célula de que são derivados: os derivados de células epiteliais são **carcinomas,** os derivados de células de tecido conjuntivo ou musculares são **sarcomas** e os derivados de células hematopoiéticas são chamados **leucemias.** Cerca de 90% dos cânceres humanos são carcinomas, sendo os cinco mais comuns o câncer de **pulmão, estômago, mama, cólon/reto e colo do útero.**

Na maioria dos casos, uma única mutação não é suficiente para converter uma célula saudável em uma célula cancerígena; várias mutações raras têm de ocorrer em conjunto

As mutações no DNA ocorrem espontaneamente a uma taxa de 10^{-6} mutações por gene, por divisão celular (ainda mais na presença de mutagênicos). Assim, como ocorrem aproximadamente 10^{16} divisões celulares no corpo humano ao longo de um tempo de vida médio, cada gene humano vai provavelmente experienciar mutação em cerca de 10^{10} ocasiões. Assim, é claro que uma única mutação não é normalmente suficiente para converter uma célula saudável em uma célula cancerígena; várias mutações raras têm de ocorrer em conjunto, tal como demonstrado por estudos epidemiológicos que mostram que, para cada câncer, a incidência aumenta exponencialmente com a idade. Foi estimado que 3-7 mutações independentes são usualmente necessárias, sendo que as leucemias aparentemente necessitam do menor número de mutações, e os carcinomas necessitam do maior.

As mutações têm de ocorrer nas células apropriadas para permitir ao neoplasma desenvolver-se, indicando que o contexto celular tem uma importante significância no tipo de câncer que subsequentemente se desenvolve

Além de desenvolver mutações promotoras de câncer, a célula em que a mutação ocorre

deve, então, ser permissiva a ser uma célula iniciadora de câncer. Isso se relaciona com o contexto celular em que um oncogene é expresso e com as propriedades atribuídas à célula pela expressão de um oncogene particular. De forma a tornar-se oncogênica e promover o crescimento de células cancerígenas, a célula deve possuir a capacidade de autorrenovação. Se a expressão de oncogenes ocorre em uma célula estaminal, a expressão do oncogene pode inibir as redes reguladoras negativas estabelecidas que normalmente parariam o crescimento e a proliferação celular, gerando, assim, uma célula estaminal cancerígena. Os cânceres como a **leucemia mieloide crônica (LMC)** e a **leucemia mieloide aguda (LMA)** podem ter origem em mutações em células estaminais. No entanto, não é essencial para a célula de origem de cânceres individuais ter origem em células estaminais. De fato, o câncer pode ter origem em mutações originárias em células progenitoras comprometidas que permitem a essas células adquirir potencial para se autorrenovar e fornecer, assim, uma fonte celular para o câncer.

Quadro de conceitos avançados

Regulação da autofagia pela família do gene ATG

A autofagia é um processo com vários passos, cujos principais reguladores são os membros da família de genes relacionados com a autofagia (ATG), composta, até a data, por 31 genes. Desde a sua descoberta inicial em *Saccharomyces cerevisiae*, têm sido identificados ortólogos (genes em diferentes espécies que evoluíram de um ancestral comum) em mamíferos, indicando que esta família de genes é conservada desde as leveduras até os humanos.

Comentário

A inibição do mTOR, mais precisamente do mTORC-1, libera a inibição da ATG13 que se pode associar à cinase ATG1, aumentando assim sua atividade catalítica e induzindo a autofagia por um mecanismo que não está bem definido. Os passos iniciais da formação do autofagossomo são mediados pelo complexo PI3K, que contém a Vps34 de mamífero (PI3K de classe III, que gera fosfatidilinositol-3-fosfato, PIP_3), o *BECN-1* e o gene supressor tumoral associado à resistência à radiação UV (UVRAG) (Fig. 42.10). O passo seguinte, o alongamento da vesícula, é mediado por dois sistemas de conjugação do tipo ubiquitina. Primeiramente, a enzima de tipo E1 ATG7 e a enzima de tipo E2 ATG10 conjugam a ATG12 com a ATG5. Em segundo lugar, a protease ATG4, a enzima de tipo E1 ATG7 e a enzima de tipo E2 ATG3 conjugam a fosfatidilitanolamina (PE) à proteína de cadeia leve 3 associada aos microtúbulos (LC3/ATG8). A ligação da PE à LC3 é crucial para sua translocação para a membrana do autofagossomo (Fig. 42.10). A conversão da forma solúvel (LC3-I) para a forma ligada à membrana (LC3-II) é amplamente utilizada como marcador experimental para a autofagia. Após sua formação, os autofagossomos sofrem maturação tornando-se autolisossomos por fusão com lisossomos, o que permite a conclusão do processo de degradação.

As mutações que levam à expressão de oncogenes estabelecidos não levam necessariamente ao desenvolvimento de câncer se ocorrerem em células não suscetíveis

Por exemplo, o cromossomo Filadélfia (t[9;22]), que origina uma proteína de fusão BCR-Abl, a qual codifica uma forma constitutivamente ativa da proteína tirosina cinase (PTK) c-Abl (mutação causadora do desenvolvimento de >95% dos casos de LMC), é detectado em um nível muito baixo nas células sanguíneas periféricas em circulação, isoladas de cerca de 30% de indivíduos saudáveis. Estudos demonstraram que a expressão de BCR-Abl só não confere propriedades de autorrenovação em células progenitoras comprometidas, indicando que são necessárias mutações secundárias para tornar essas células cancerígenas. Esse achado sugere que a expressão de oncogenes como o BCR-Abl em um ambiente de célula estaminal pode permitir que esta se ligue à iniciação do programa neoplásico.

Quadro de conceitos avançados

Os eventos oncogênicos são dependentes do contexto celular

Apesar de as mutações genéticas serem comuns e expectáveis, com perda de função na p53, PTEN e Rb, e ganho de função com o *Ras*, o sequenciamento do genoma identificou também mutações em genes "não expectáveis" em determinados cânceres. Por exemplo, o gene *Notch* está mutado para formar uma forma constitutivamente ativa da proteína Notch, e está ligado ao desenvolvimento de cerca de 50% dos casos de **leucemia linfoblástica aguda de células T (T-LLA).** No entanto, mutações ativadoras no Notch1 foram também identificadas em doenças da linhagem B, incluindo a **leucemia linfocítica crônica de linfócitos B (B-LLC)** e o linfoma de células do manto (MCL). Recentemente foi identificada uma mutação inativadora do Notch no carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, indicando que apesar de o Notch atuar nas linhagens hematopoiéticas como promotor tumoral, pode comportar-se como supressor tumoral na carcinogênese de células escamosas.

Foram também identificadas alterações na expressão de genes como mecanismo para o desenvolvimento/promoção de tumores. De fato, os padrões de expressão de isoformas específicas da proteína cinase C (PKC) estão desregulados em um conjunto de cânceres, possivelmente por meio de alterações na regulação epigenética da expressão gênica. Em particular, a PKCα está sobrerregulada nos cânceres de mama, gástricos, da próstata e cerebrais, sugerindo que esta contribua para a tumorigênese. Além disso, os níveis de expressão de PKCα foram também relacionados com a agressividade e com a capacidade invasora de células de câncer de mama. No entanto, a expressão de PKCα está sub-regulada nos cânceres colorretal, epidermal e pancreático e na B-LLC, sugerindo que a PKCα pode também funcionar como supressor tumoral. Quando analisadas em conjunto, estas descobertas indicam que a célula em que a mutação ou a modulação da expressão de uma proteína ocorre tem direta influência na probabilidade de formação de um câncer.

Promotores tumorais: oncogenes

As mutações que levam à proliferação descontrolada de células cancerígenas podem resultar da disrupção do controle da divisão celular normal ou, alternativamente, de uma redução dos processos normais de diferenciação terminal ou apoptose. Essa distinção se reflete nos dois grupos principais de genes que são alvo de mutações no câncer: **oncogenes** e **genes supressores tumorais.**

Os oncogenes foram primeiramente identificados como genes virais que infectam as células normais e as transformam em células tumorais

O vírus do sarcoma de Rous, um retrovírus que causa tumores do tecido conjuntivo de galinhas, infecta e transforma os fibroblastos cultivados em cultura de células. As células transformadas crescem mais do que as células normais e apresentam várias anomalias de crescimento, tais como a perda da inibição do crescimento mediada pelo contato celular e a perda da dependência de ancoragem para o crescimento. Além disso, as células têm uma aparência arredondada e podem proliferar na ausência de fatores de crescimento. Adicionalmente, as células são imortais, não entram em senescência e podem induzir a formação de tumor quando injetadas em um hospedeiro animal apropriado, confirmando sua capacidade de autorrenovação.

A chave para a compreensão da transformação da célula reside na mutação de um gene celular normal que controla o crescimento celular

O uso do vírus do sarcoma de Rous mutante que, apesar de se multiplicar normalmente, perdeu a capacidade de transformar as células hospedeiras, demonstrou que é o gene *Src* o responsável pela transformação celular. O avanço da nossa compreensão de como este único gene poderia transformar células em cultura aconteceu quando se tornou evidente que o oncogene viral era um homólogo mutado de um gene celular normal. Esse gene é agora denominado proto-oncogene *c-Src,* e foi identificado como uma PTK transdutora de sinal envolvida no controle normal do crescimento celular. Como a expressão desse gene não é essencial para a sobrevivência do retrovírus, é provável que o *Src* tenha sido acidentalmente incorporado pelo vírus a partir do genoma de um hospedeiro anterior, e que de alguma forma tenha sido mutado durante o processo. No caso do vírus do sarcoma de Rous, os íntrons normalmente presentes no *c-Src* são removidos por *splicing,* e adicionalmente ocorre um conjunto de mutações que vão causar substituições de aminoácidos, resultando em uma PTK constitutivamente ativa.

A transformação celular pode, porém, resultar também de oncogenes que não são constitutivamente ativos, mas em vez disso são sobre-expressos originando um número muito elevado de cópias, como consequência do gene estar sob o controle de potentes promotores ou ativadores no genoma viral. Alternativamente, no caso dos retrovírus, as cópias de DNA do RNA viral podem ser inseridas no genoma do hospedeiro, próximo ou nos locais dos proto-oncogenes (mutação por inserção), causando a ativação anormal desses proto-oncogenes. Nesta situação, o genoma alterado é herdado por toda a progênie da célula hospedeira original.

A maioria dos tumores humanos não é de origem viral e surge de mutações espontâneas ou induzidas

Aproximadamente 85% dos tumores humanos surgem como resultado de mutações pontuais ou deleções. Essas mutações podem ser espontâneas ou induzidas por carcinógenos ou radiação, resultando em sobre-expressão ou hiperatividade dos proto-oncogenes. De fato, o *Ras*, que tem sido encontrado mutado em uma forma constitutivamente ativa em aproximadamente 25% de todos os tumores, aparenta em última análise exercer muitos de seus efeitos, se não todos, por sobrerregulação das concentrações de ciclina D, estimulando assim a progressão do ciclo celular. Essa sobrerregulação da expressão da ciclina D é resultante da estimulação da cascata MAPK pelo *Ras*, e da indução do fator de crescimento AP-1, o qual regula a indução da expressão da ciclina D.



Quadro clínico

mTOR no câncer e distúrbios metabólicos

Devido ao seu papel fundamental na regulação da proliferação/sobrevivência celular e à sua estreita relação com a via da fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K), os componentes da via do mTOR estão muitas vezes disfuncionais em muitos tipos de câncer e distúrbios metabólicos. O **complexo esclerose tuberosa** (TSC) é uma doença genética autossômica dominante que ocorre como resultado de mutações inativadoras nos genes *TSC1* ou *TSC2*. O TSC se caracteriza por múltiplos tumores benignos, tais como o angiofibroma da pele, o linfangioleiomioma dos pulmões, o angiomiolipoma renal e o astrocitoma cerebral.

No contexto do eixo mTORC-1, o Tsc1/2 serve de centro de retransmissão para as condições do microambiente tumoral. Em circunstâncias normais, hipoxia (via Hif1α), lesão de DNA (via p53) e privação de nutrientes (via fator de transcrição LKB1) ativam o Tsc1/2 para regular o complexo mTORC-1, controlando assim os processos biossintéticos. Estas vias são inativadas durante a tumorigênese, geralmente pela ação cooperativa das vias oncogênicas PI3K/PDK1 e *Ras*/MAPK para reduzir a atividade do Tsc1/2. A sobrerregulação da sinalização mTORC-1 leva à ativação aumentada da biossíntese de proteínas e lipídios, que sustentam as necessidades bioenergéticas das energeticamente exigentes células tumorais em proliferação. A elevada síntese proteica promove muitas vezes a expressão aumentada dos reguladores do ciclo celular, tais como a ciclina D1 e a ciclina E, enquanto a constitutivamente ativa Akt contribui para a inativação dos inibidores do ciclo celular p27 e p21. O papel do mTORC-2 na tumorigênese ainda não está bem definido; contudo, parte do complexo mTORC-2 denominado Rictor é sobre-expresso em muitos gliomas. Essa expressão aumentada promove a montagem e ativação do complexo mTORC-2, permitindo que as células tenham uma maior proliferação e invasão. Estes eventos sugerem que o câncer pode ser considerado um distúrbio metabólico.

De fato, também tem sido demonstrado que a desregulação da via mTOR contribui para o desenvolvimento de vários distúrbios metabólicos, como **obesidade, esteatose hepática não alcoólica e diabetes tipo 2.** Por exemplo, no hipotálamo, a leptina transmite sinais via mTORC-1 para a redução da ingesta alimentar. A sobreativação do mTORC-1, devido a uma dieta rica em gordura, pode promover a obesidade ao favorecer resistência aos sinais anorexigênicos induzidos pela leptina, estimulando assim a hiperfagia. Adicionalmente, a ativação aumentada do mTORC-1 promove a adipogênese e a expansão do tecido adiposo, inibe a sinalização da insulina nos músculos esqueléticos, fígado e pâncreas, ao promover a resistência à insulina, e contribui para a indução da apoptose nas células β pancreáticas por exaustão dos processos homeostáticos de compensação das células β.

O sequenciamento completo do exoma/genoma de pacientes individuais, utilizado para determinar o panorama mutacional específico dentro dos subtipos de câncer, tem realçado ligações a serem estabelecidas entre cânceres aparentemente diferentes que resultam de mutações genéticas semelhantes

É de notar que a presença da mutação B-Raf^{V600E} foi recentemente descoberta em todos os pacientes avaliados com **leucemia das células pilosas** (HCL). A B-Raf^{V600E} é oncogênica em uma série de tumores, incluindo o melanoma, codificando a B-Raf cinase ativa que leva à ativação constitutiva da via de sinalização MEK/ERK. Essa mutação tem um impacto maior no ciclo celular. De realçar que agora que a mutação B-Raf^{V600E} foi identificada como um evento causal/impulsionador da HCL, apresenta-se a oportunidade de elaboração de terapêuticas dirigidas, como o PLX-4720, um inibidor específico da B-Raf ativa, que de outra forma não teria sido considerado para o tratamento da HCL. A identificação de mutações indutoras específicas em uma célula cancerígena em particular oferece a possibilidade de tratar pacientes com uma terapêutica dirigida a essa mutação.

A cariotipagem de células tumorais tem demonstrado também que a translocação cromossômica pode colocar o oncogene sob o controle de um promotor inapropriado. Por exemplo, no linfoma de Burkitt, a sobre-expressão do gene *Myc* ocorre por meio de sua translocação para a proximidade de um dos *loci* Ig. Como o *Myc* normalmente atua como um sinal proliferativo nuclear, sua sobre-expressão induz a divisão celular, mesmo sob condições que normalmente determinariam a interrupção do crescimento.

Genes supressores tumorais: subversão do ciclo celular

As mutações em genes supressores tumorais são recessivas e, portanto, mutações em ambas as cópias do gene são geralmente necessárias para a transformação. Como é muito difícil identificar a perda de função de um único gene em uma célula, grande parte da informação inicial relacionada com genes supressores tumorais foi obtida pelo estudo de uma variedade de síndromes de cânceres hereditários (Tabela 42.1).

Tabela 42.1

Síndromes selecionadas de cânceres hereditários

Síndrome	Câncer	Produto gênico
Li-Fraumeni	Sarcomas, carcinomas adrenocorticais, carcinomas de mama, pulmão, laringe. Tumores do cólon e cerebrais e leucemias	p53: fator de transcrição, danos no DNA e estresse
Retinoblastoma familiar	Retinoblastoma, osteossarcoma	Rb1: ciclo celular e regulação transcricional
Polipose adenomatose familiar (FAP)	Câncer colorretal; adenomas colorretais, tumores duodenal e gástrico, osteomas do maxilar e tumores desmoides (síndrome de Gardner), meduloblastoma (síndrome de Turcot)	APC: regulação da β-catenina, ligação aos microtúbulos
Síndrome de Wiedmann-Beckwith	Tumor de Wilms, organomegalia, hemi-hipertrofia, hepatoblastoma, câncer adrenocortical	P57/KIP2: regulador do ciclo celular
Síndrome do tumor hamartoma PTEN	Tumores benignos: mama, tireoide, colorretal, endometrial e câncer do rim	PTEN: fosfatase de proteínas e lipídios, regulação da cinase Akt e do ciclo celular
Neurofibromatose tipo 1 (NF1)	Neurofibrossarcoma, LMA, tumores cerebrais	Proteína ativadora da GTP-ase (GAP) para Ras
Câncer renal papilar hereditário	Câncer renal	Receptor MET para o HGF
Melanoma familiar	Melanoma, câncer pancreático, nevos displásicos, sinais de pele atípicos *(atypical moles)*	p16 (CDK): inibidor de cinase dependente de ciclina (CDK4/6)

LMA, leucemia mieloide aguda; HGF, fator de crescimento do hepatócito; KIP2, inibidor de 57 kDa dos complexos ciclina-CDK.

p53: a guardiã do genoma

A proteína p53 desempenha um papel crítico na regulação da transição das fases G1/S do ciclo celular e na monitorização de danos no DNA, e torna-se ativada após detectar danos, estresse e sinais oncogênicos para induzir a interrupção do ciclo celular e/ou a morte. Desta forma, não é surpreendente que a função da p53 esteja frequentemente comprometida em células cancerígenas. Este comprometimento pode ocorrer por intermédio de mutações diretamente inativadoras da função da p53, anulando sua função transcricional, ou por desregulação das vias responsáveis pela ativação da p53. A importância da p53 é destacada em indivíduos que têm apenas uma cópia funcional do gene *p53*. As pessoas com esta síndrome, chamada **síndrome de Li-Fraumeni,** estão predispostas a desenvolver uma grande variedade de tumores, incluindo sarcomas, carcinomas do pulmão, mama, laringe e cólon, tumores cerebrais e leucemias. Essa síndrome é rara, e as células tumorais em indivíduos afetados exibem defeitos em ambas as cópias do *p53*. A deleção do *p53*, além de permitir a progressão descontrolada pelo ciclo celular, permite também a replicação de DNA danificado, levando a mais mutações carcinogênicas ou a amplificação gênica.

Fosfatase e homólogo TENsin (PTEN)

A PTEN supressora tumoral é uma das proteínas mais frequentemente inativadas no câncer esporádico

Conforme descrito anteriormente, as vias de sinalização mediadas pela PI3K são ativadas em resposta a um grande número de estímulos de fatores de crescimento, resultando na promoção do crescimento, sobrevivência e proliferação celular. A principal proteína responsável pela atenuação da atividade da PI3K e das vias a jusante é a fosfatase de proteínas e lipídios de especificidade dupla PTEN. Essa proteína reverte a atividade da PI3K ao desfosforilar a PIP_3. A PTEN supressora tumoral é uma das proteínas mais regularmente inativadas no câncer esporádico, resultando em uma sinalização PI3K/Akt mantida e em uma sobrevivência e proliferação celular descontrolada. Foram identificadas mutações na PTEN em uma variedade de cânceres, incluindo de mama, tireoide, próstata e cânceres cerebrais. Curiosamente, indivíduos com mutações da linha germinal herdadas no PTEN, conhecidas como síndrome do tumor hamartoma PTEN, desenvolvem tumores benignos associados a mama, tireoide, cólon/reto, endométrio e rim. No entanto, estes pacientes comportam um elevado risco ao longo da vida de desenvolver cânceres malignos nestes tecidos. A suscetibilidade aumentada ao câncer em células que transportam mutações da linha germinal no PTEN sublinha a importância dessa proteína como supressor tumoral.



Quadro clínico

Mutações específicas que definem uma terapêutica do câncer

Na maioria dos casos é necessário um número de mutações para transformar uma célula saudável em uma célula cancerígena. Uma possível exceção a esta regra é a **leucemia mieloide crônica** (LMC) que se desenvolve em 95% dos casos como resultado de uma translocação entre o cromossomo 9 e 22 (t[9;22]), originando o cromossomo Filadélfia, no compartimento das células estaminais hematopoiéticas. Este tipo de translocação também pode ser encontrado em 25%-30% dos casos de **leucemia linfoblástica aguda** (LLA) e em uma minoria dos casos de **leucemia mieloide aguda** (LMA). A translocação leva à formação de um produto de fusão entre *BCR (breakpoint cluster regions)* e o gene *ABL* da proteína tirosina cinase Abl, resultando na produção constitutiva da proteína de fusão BCR-Abl, que apresenta uma atividade proteína tirosina cinase (PTK) aumentada. Como a Abl regula várias proteínas envolvidas no ciclo celular, o resultado da expressão de BCR-Abl é o aumento da divisão celular, levando à sobreprodução de células da linhagem mieloide. Adicionalmente, a BCR-Abl inibe os mecanismos de reparação de DNA, levando à instabilidade genômica, a qual permite que as células acumulem várias mutações adicionais que precipitam a progressão da doença. Isto conduz a doença, de sua fase crônica, que é estável durante vários anos, em direção a uma fase de crise blástica/aguda.

Comentário

A BCR-Abl foi uma das primeiras proteínas para a qual foram desenhados fármacos específicos para antagonizar o transdutor de sinal de interesse, a chamada terapêutica dirigida. O Imatinib (Glivec®) é um inibidor tirosina cinase (TKI) desenvolvido pela Novartis para inibir especificamente a atividade da cinase Abl. Apesar da incapacidade para erradicar completamente as células LMC, este reduziu sua taxa de proliferação e atrasou o início de uma crise blástica. Enquanto o imatinib é um fármaco importante no tratamento da maioria dos pacientes com LMC, uma pequena porcentagem de pacientes é resistente, ou torna-se resistente, ao tratamento com imatinib, possivelmente devido a mutações adquiridas dentro do *BCR-Abl*, o que tem levado ao desenvolvimento de terapêuticas de segunda (p. ex., dasatinib e nilotinib) e terceira linha para a LMC. É de salientar que, até a presente data, as terapêuticas com TKI não têm sido eficazes na erradicação das células estaminais da LMC, que constituem a base da doença; desta forma, existe o risco de recidiva em pacientes tratados com TKI se a terapêutica for interrompida ou se estes desenvolverem quimiorresistência.

Resumo

- A maioria dos proto-oncogenes e dos genes supressores de tumor têm uma função associada à transdução de sinal, mimetizando os efeitos da estimulação mitogênica persistente e, dessa forma, desacoplando as células de seus controles externos normais.
- Essas vias de sinalização convergem na maquinaria que controla a passagem da célula por meio da fase G1 e impede a saída do ciclo celular.
- Além disso, outros genes, muitos dos quais são alvo de translocações cromossômicas específicas de câncer e de regulação epigenética, levam a decisões do destino celular que normalmente induziriam a apoptose. As duas proteínas supressoras de tumor, p53 e PTEN, que têm funções-chave ao determinarem a progressão no ciclo celular e a apoptose, e os genes que codificam essas proteínas são mais frequentemente comprometidos nas células cancerosas.

Questões para aprendizagem

1. Como é a progressão por meio do ciclo celular regulado?
2. Descreva, com referência a exemplos específicos, como a ligação ao receptor de fatores de crescimento medeia a proliferação celular.
3. Destaque os mecanismos distintos pelos quais a célula pode ser submetida à morte celular.
4. Explique, com exemplos específicos, como mutações selecionadas em sinais de crescimento normais podem dar origem a fenótipos cancerígenos em células humanas.

Leituras sugeridas

Chiara Maiuri, M., Zalckvar, E., Kimchi, A., et al. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8:741–752.

Dick, J. E. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood*. 2008; 112:4793–4807.

Hollander, M. C., Blumenthal, G. M., Dennis, P. A. PTEN loss in the continuum of common cancers, rare syndromes and mouse models. *Nat Rev Cancer*. 2011; 11:289–301.

Hotchkiss, R.S., Strasser, A., McDunn, J.E., et al. *Cell Death*. 2009; 361:157–183.

Laplante, M., Sabatini, D. M. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*. 2012; 149:274–293.

Levine, A. J., Oren, M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9:749–758.

Malumbres, M., Barbacid, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9:153–166.

Taylor, R. C., Cullen, S. P., Martin, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008; 9:231–241.

Sites

Nature's Encyclopedia of Life Sciences: www.els.net/

Kimball's Biology Pages: http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/A/Apoptosis.html

KEGG – Human Cell Cycle: www.genome.jp/kegg/pathway/hsa/hsa04110.html

CAPÍTULO 43

Envelhecimento

John W. Baynes

Objetivos

Após concluir este capítulo, o leitor estará apto a:

- Descrever a correlação entre envelhecimento e doença.
- Explicar o gráfico de Gompertz e como ele descreve a taxa de envelhecimento nas diferentes espécies.
- Diferenciar entre as teorias biológicas e químicas do envelhecimento.
- Explicar os preceitos da teoria do envelhecimento pelos radicais livres, incluindo a identificação dos produtos característicos de oxidação que se acumulam, com a idade, em proteínas de vida longa.
- Delinear as evidências de que a taxa de mutação do DNA é um determinante importante na velocidade do envelhecimento.
- Delinear as evidências que sustentam a teoria mitocondrial do envelhecimento e descrever como essa teoria faz a interface com a teoria do envelhecimento pelos radicais livres.
- Descrever a etiologia e a patologia característica de diversas doenças do envelhecimento acelerado.
- Descrever os efeitos da restrição calórica na taxa de envelhecimento em roedores.

Introdução

O envelhecimento pode ser definido como uma deterioração, dependente do tempo, das funções de um organismo

Embora os efeitos do envelhecimento sejam amplamente baseados na fisiologia, ele é fundamentalmente o resultado de alterações na função, na estrutura, na bioquímica e no metabolismo celular (Tabela 43.1). O resultado do envelhecimento, mesmo saudável, é o

aumento da suscetibilidade a doenças e o da probabilidade de morte – o ponto final do envelhecimento. Entretanto, o envelhecimento não é uma doença; ele afeta a todos nós, seja de forma programada ou estocástica, e as doenças acomete uma fração da população.

Tabela 43.1

Mudanças nos sistemas bioquímico e fisiológico durante o envelhecimento

Bioquímica	Fisiológica
Taxa metabólica basal	Volume de expansão pulmonar
Taxa de renovação (*turnover*) de proteínas	Capacidade de filtração renal (glomerular)
Tolerância à glicose	Capacidade de concentração renal (tubular)
Capacidade reprodutiva	Desempenho cardiovascular
Encurtamento de telômero	Sistema musculoesquelético
Fosforilação oxidativa	Velocidade de condução nervosa
	Sistemas endócrino e exócrino Defesas imunológicas Sistemas sensoriais (visão, audição)

Com o envelhecimento da população, a gerontologia e a medicina geriátrica estão se tornando cada vez mais importantes. Este capítulo apresenta uma visão geral das alterações bioquímicas e fisiológicas associadas ao envelhecimento, seja de forma geral ou devido ao envelhecimento de sistemas de órgãos específicos. Ele inclui uma revisão das teorias atuais do envelhecimento (há diversas teorias e, normalmente, quanto mais teorias existem, menos realmente entendemos a respeito de algum assunto) e conclui com uma discussão da correlação entre câncer e envelhecimento, além de uma atualização das abordagens quanto ao aumento da expectativa de vida.

Envelhecimento de sistemas complexos

Excluindo-se os defeitos genéticos, as doenças da infância e os acidentes, os seres humanos sobrevivem até aproximadamente os 50 anos com necessidades limitadas de manutenção ou risco de morte. A partir de então, tornamo-nos cada vez mais frágeis, e nossa taxa de mortalidade aumenta com o tempo, alcançando o máximo em torno dos 76 anos. Nossa expectativa de vida é afetada pela nossa genética e exposição ambiental, e nossa morte é normalmente atribuída à falência de um sistema de órgãos críticos (cardiovascular, renal, pulmonar etc.). Normalmente, a capacidade desses sistemas fisiológicos interdependentes declina, como uma função linear da idade, o que leva a aumento exponencial da nossa taxa de morte específica por idade (Fig. 43.1). Historicamente, a melhora nos cuidados de saúde e do ambiente levou a uma **"retangularização" da curva de sobrevida** – nossa expectativa de vida média aumentou, porém sem um efeito significativo na expectativa de vida máxima (Fig. 43.1A).

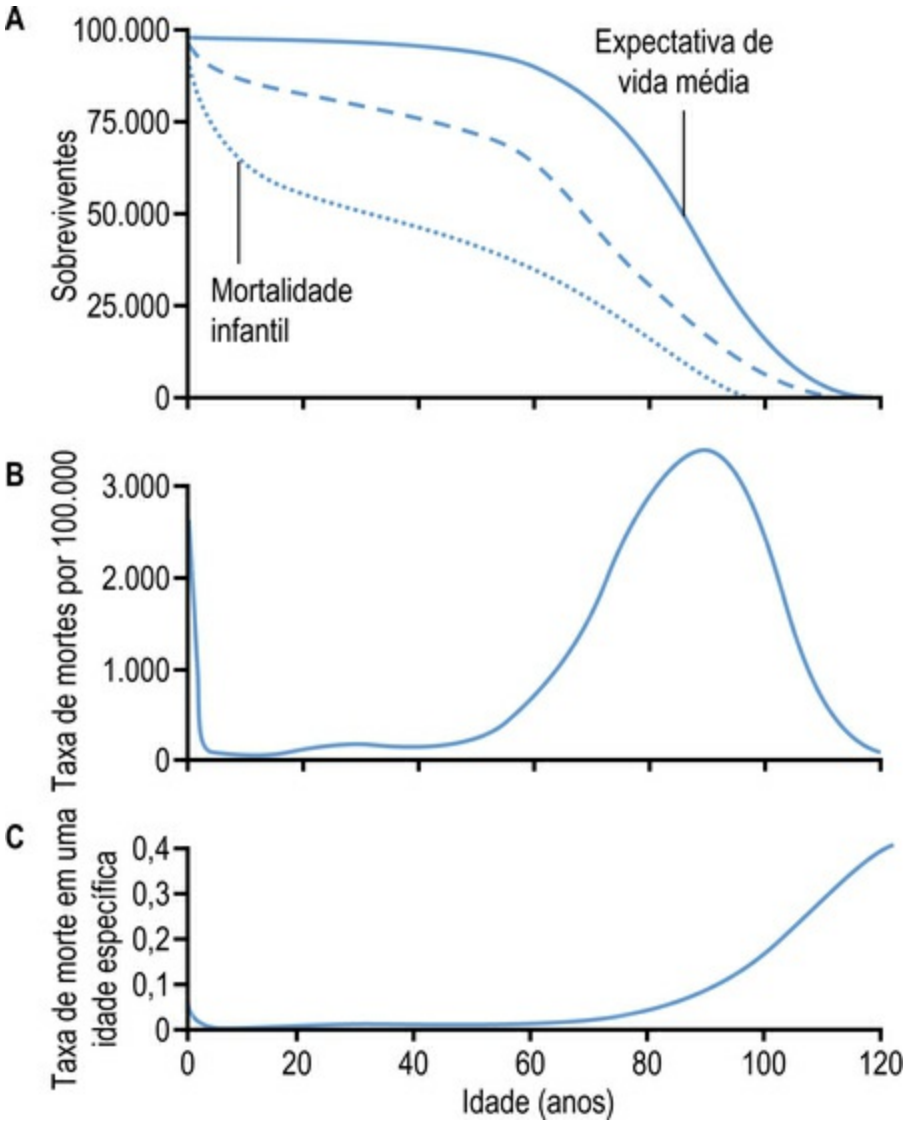


FIG. 43.1 Curva de sobrevivência e taxa de morte.
(A) A **expectativa de vida média** é definida como a idade na qual 50% da população sobrevivem (ou morrem). A inclinação negativa da curva de sobrevivência atinge um máximo na expectativa de vida média de uma espécie. A linha pontilhada descreve uma curva de sobrevivência para o Terceiro Mundo, onde a mortalidade infantil e as doenças diminuem de forma significativa a expectativa de vida média. A linha tracejada descreve uma curva de sobrevivência para os Estados Unidos no início do século XX. A linha sólida refere-se à Europa no século XXI. **(B)** A **taxa de morte** alcança o máximo na expectativa de vida média. **(C)** A **taxa de morte específica para a idade**, definida como o número de mortes em uma determinada idade por tempo (p. ex., mortes por 100.000 pessoas de uma idade específica por ano), aumenta exponencialmente com a idade. A expectativa de vida ou a expectativa de vida potencialmente máxima (MLSP) é definida como a idade máxima que pode ser atingida por um membro da população, que é em torno de 120 anos para os seres humanos.

O limite de Hayflick – a senescência replicativa

A capacidade replicativa das células diminui com a idade

As células diferenciadas de animais passam por somente um número limitado de divisões celulares (duplicação da população) em cultura de tecidos, a não ser que elas sejam transformadas em células cancerígenas, seja por meio de mutação, seja pela infecção com determinados vírus. O número potencial das divisões celulares é maior em animais de vida longa, sugerindo uma correlação entre potencial de divisão celular e

longevidade. Os fibroblastos neonatais humanos irão se dividir em torno de 60 vezes e, depois, entrar em um estado de não divisão, enquanto os fibroblastos de camundongos e de ratos, que têm expectativa de vida mais curta, passam por menos divisões celulares *in vitro*. As células de doadores mais jovens têm maior capacidade de replicação e maior número de divisões celulares em cultura de células; no entanto, o número de células que se dividem diminui com a idade. Essa limitação da capacidade de duplicação, descrita pelo doutor Leonard Hayflick, é conhecida como **limite de Hayflick**. A relevância do limite de Hayflick para o envelhecimento humano ainda está em debate – certamente as células humanas mantêm alguma capacidade de replicação, mesmo em idades avançadas, e os principais tecidos, como os músculos e os nervos, são basicamente pós-mitóticos, isto é, não se dividem ativamente. Entretanto as alterações no metabolismo de células senescentes, incluindo a resposta diminuída aos hormônios e o declínio de suas capacidades de síntese e de degradação, como, por exemplo, nos sistemas imunológico e reticuloendotelial, podem afetar nosso poder de adaptação e a suscetibilidade ao estresse e às doenças relacionadas com a idade, colocando limites na nossa expectativa de vida.

Modelos matemáticos do envelhecimento

Em poiquilotérmicos, a velocidade de envelhecimento está correlacionada com a temperatura, a atividade física e a taxa metabólica

No início do século XIX, Gompertz observou que a taxa de mortalidade específica por idade em humanos aumentava exponencialmente após os 35 anos de idade e que as curvas de sobrevivência de humanos podiam ser modeladas pelo que atualmente é conhecido como **equação de Gompertz** (Fig. 43.2):

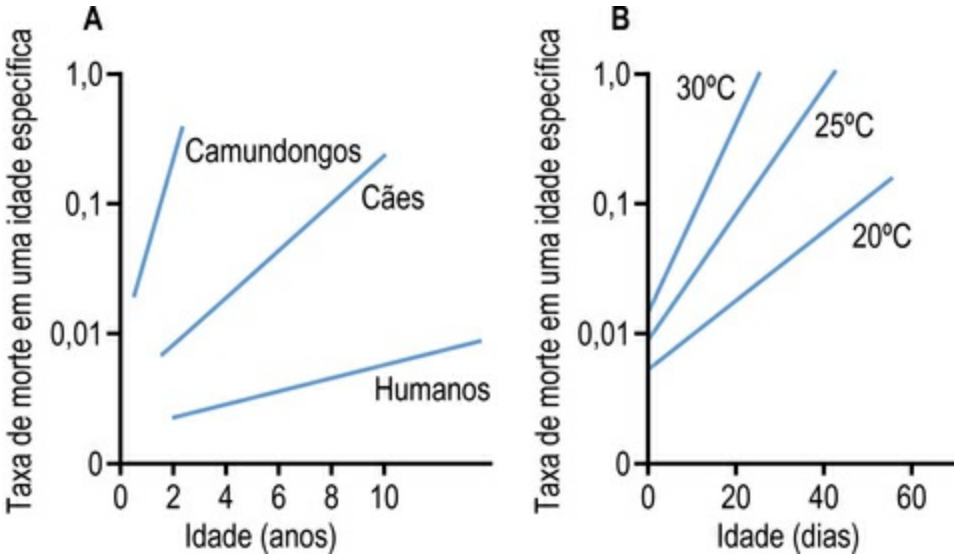


FIG. 43.2 Gráficos de Gompertz para os seres humanos e outras espécies. **(A)** Humanos e outros vertebrados. **(B)** Moscas criadas em diversas temperaturas (adaptado do trabalho do professor R.S. Sohal).

$$m_t = Ae^{\alpha t}$$

O termo m_t é a taxa de mortalidade específica por idade na idade t; α é a inclinação, o efeito do tempo na taxa de mortalidade; A, o intercepto no eixo y, é a taxa de mortalidade ao nascimento. A equação de Gompertz-Makeham

$$m(t) = Ae^{\alpha t} + B$$

adiciona uma constante B para fazer a correção em relação à taxa de mortalidade independente da idade, por exemplo, como resultado da mortalidade infantil ou acidental, e fornecer um melhor ajuste aos dados atuariais.

Os gráficos de Gompertz na Figura 43.2 ilustram as alterações dependentes do tempo na taxa de mortalidade para três diferentes espécies de vertebrados e para moscas mantidas em diferentes temperaturas. Os mamíferos de vida curta têm uma taxa ajustada à idade (α = inclinação) maior, enquanto a taxa de mortalidade para os poiquilotérmicos varia com a temperatura ambiente – as moscas vivem mais quando crescem em temperaturas mais baixas. Essa observação foi interpretada como evidência para as teorias de envelhecimento **"taxa de sobrevivência"** ou **"teoria do desgaste"**. As moscas, sendo mais ativas em altas temperaturas, consomem mais energia e morrem mais rápido. As moscas que são mantidas, por exemplo, em uma caixa de fósforos em vez de em garrafões maiores também viveram mais; moscas sem asas vivem mais; moscas machos, segregadas das fêmeas, também vivem mais. Em cada caso, em pequenos enclausuramentos, com a falta de asas e na ausência do sexo oposto, os machos são menos ativos, têm taxas metabólicas basais menores e expectativas de vida média e máxima maiores. Nenhuma dessas estratégias para o aumento da expectativa de vida é aplicável aos seres humanos.

Teorias do envelhecimento

As teorias do envelhecimento podem ser divididas em duas categorias gerais: biológicas e químicas

As teorias biológicas tratam o envelhecimento como um evento controlado geneticamente, determinado pela expressão programada ou repressão da informação genética. O envelhecimento e a morte são vistos como o estágio final orquestrado pelo nascimento, crescimento, maturação e reprodução. A apoptose (morte celular programada) e a involução tímica são exemplos de eventos geneticamente programados ao nível celular e de órgãos, e o declínio dos sistemas imunológico, neuroendócrino e reprodutivo pode ser observado em um contexto mais amplo como evidência da ação de um relógio biológico que afeta as funções integradas de um organismo. As teorias biológicas atribuem as diferenças na expectativa de vida às diferenças genéticas das

interespécies, mas também fornecem uma explicação para a observação de que há um componente genético para a longevidade das espécies – por exemplo, nas famílias com história de longevidade. As diferenças na expectativa de vida entre as espécies também se correlacionam fortemente com a eficiência dos mecanismos de reparo do DNA. As espécies de vida longa têm processos de reparo de DNA mais eficientes (Fig. 43.3). Diversas doenças do envelhecimento acelerado (progeria) também ilustram a importância da genética e a manutenção da integridade do genoma durante o envelhecimento.

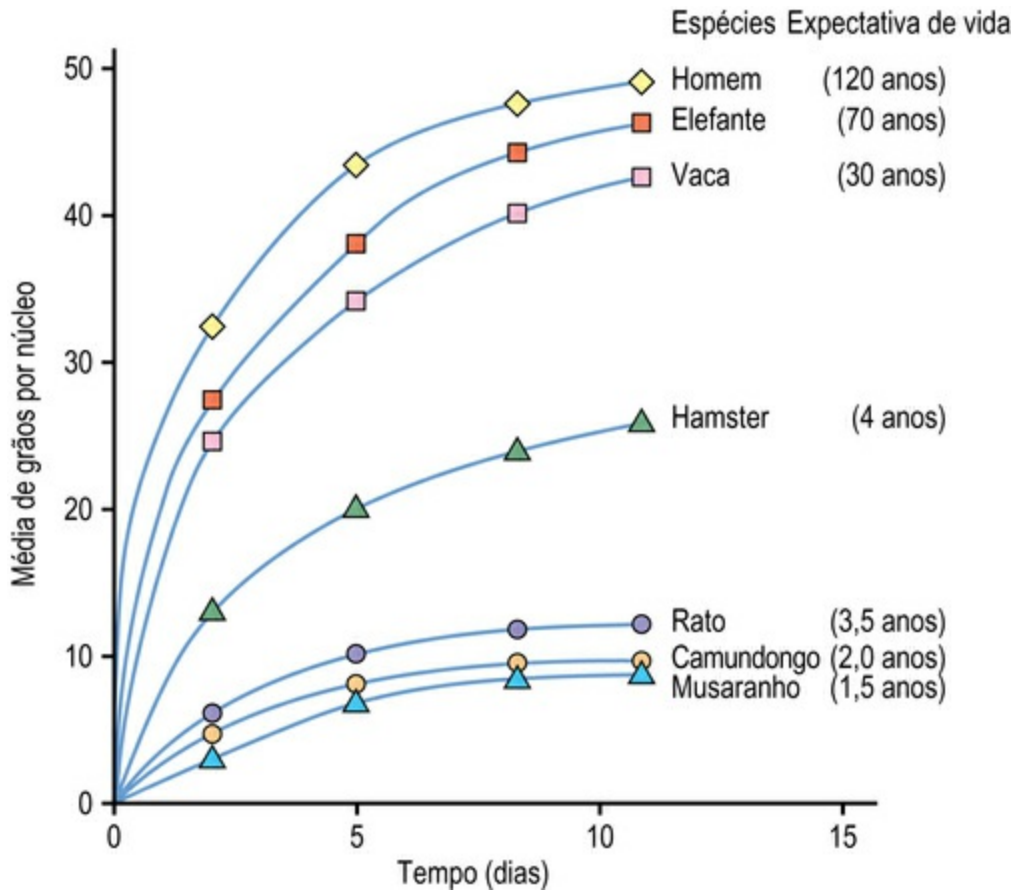


FIG. 43.3 Correlação entre a atividade de reparo do DNA e a longevidade. Fibroblastos de várias espécies foram rapidamente irradiados, formando dímeros de timina e timina glicol (Cap. 31). As bases oxidadas são removidas e substituídas pelo reparo por excisão. O reparo do DNA foi avaliado pela taxa de incorporação de um traçador de [^{3}H]timidina no DNA por autorradiografia (adaptado de Hart RW, Setlow RB. Correlation between deoxyribonucleic acid excision-repair and life-span in a number of mammalian species. Proc Natl Acad Sci USA71:2169-2173, 1974).

As teorias químicas do envelhecimento o tratam como um processo somático que resulta de danos acumulativos às biomoléculas. Em um extremo, a **teoria do erro catastrófico** propõe que o envelhecimento é o resultado de erros acumulativos na maquinaria para replicação, reparo, transcrição e tradução da informação genética. Por fim, os erros em enzimas críticas, como a DNA e a RNA polimerase ou as enzimas envolvidas na síntese e na taxa de renovação de proteínas, gradualmente afetam a fidelidade da expressão da informação genética e permitem o acúmulo de proteínas alteradas. A propagação dos erros e o resultante acúmulo das macromoléculas disfuncionais levam por fim ao colapso do sistema. Consistente com essa teoria,

quantidades crescentes de enzimas funcionalmente inativas, imunologicamente detectáveis, porém desnaturadas ou modificadas, se acumulam nas células como função da idade.

Teorias químicas mais gerais tratam o envelhecimento como resultado crônico da modificação química **(não enzimática)** acumulativa, de lesão ou dano de todas as biomoléculas (Tabela 43.2). Da mesma forma que a ferrugem e a corrosão, o acúmulo do dano com a idade gradualmente afeta a função. Esse dano é mais aparente em proteínas de tecidos de vida longa, como as lentes do cristalino e os colágenos extracelulares, os quais acumulam modificações químicas com a idade. Essas proteínas gradualmente tornam-se acastanhadas com a idade, como resultado da formação de uma grande quantidade de compostos conjugados que absorvem na região amarelo-avermelhada do espectro (Fig. 43.4); no cristalino, elas atuam como um filtro, contribuindo para a perda da visão cromática com a idade. Cristalinos altamente modificados, as principais proteínas no cristalino, precipitam-se gradualmente, levando ao desenvolvimento de cataratas. Também ocorre dano químico à integridade do genoma, porém é mais difícil de ser quantificado por causa da eficiência do processo de reparo que faz a excisão e o reparo dos nucleotídios modificados. Como pode ser observado na Tabela 43.2, existem diversas consequências silenciosas do dano em DNA. Esse dano é principalmente endógeno, mas é aumentado pela ação de xenobióticos e de agentes ambientais.

Tabela 43.2

Alterações químicas em biomoléculas dependentes da idade

Modificação nas proteínas	Modificação no DNA e mutação	Outros
Ligações cruzadas (*crosslinking*)	Oxidação	Lipofuscina
Oxidação	Depurinação	Enzimas inativas
Desaminação	Substituições	
d-aspartato	Inserções e deleções	
Proteínas carboniladas	Inversões e transposições	
Glicoxidação		
Lipoxidação		

Proteínas de vida longa, como as lentes do cristalino e os tecidos colagenosos, acumulam danos com a idade. A modificação e as ligações cruzadas (*crosslinking*) de proteínas ocorrem como resultado de mecanismos não oxidativos (desaminação, racemização) ou oxidativos (proteínas carboniladas) ou por reações de proteínas com produtos de carboidratos ou peroxidação lipídica (glicoxidação, lipoxidação). O dano ao DNA é frequentemente silencioso, isto é, formas modificadas de nucleotídios podem não se acumular, porém o dano aumenta na forma de mutações que resultam de erros no reparo.

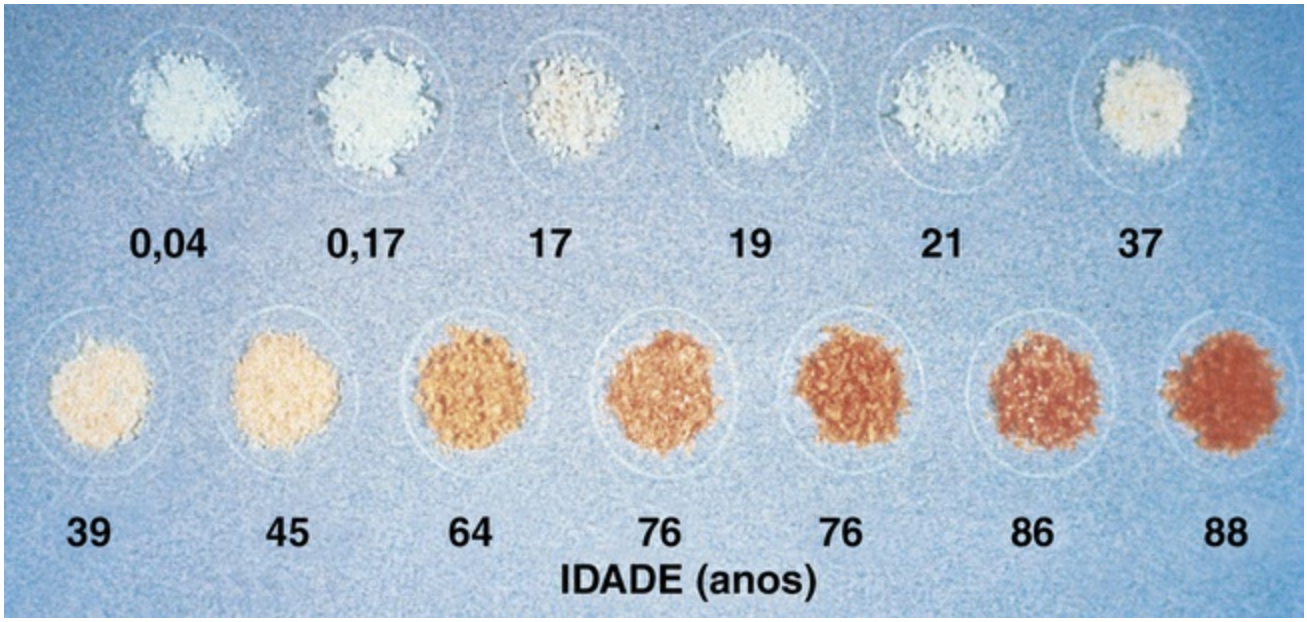


FIG. 43.4 Alterações da cartilagem costal com a idade. O acastanhamento é um aspecto característico do envelhecimento de proteínas, não só no cristalino, o qual é exposto à luz do sol, mas também do colágeno dos tecidos em todo o organismo. As ligações cruzadas (*crosslinking*) de proteínas também aumentam o acastanhamento e contribuem para a insolubilidade gradual das proteínas do cristalino com a idade. As ligações cruzadas dos colágenos articulares e vasculares diminuem a elasticidade dos discos vertebrais e a flexibilidade da parede vascular com a idade. Essas alterações nas proteínas extracelulares são semelhantes às alterações induzidas pela reação de carboidratos e lipídios com proteínas durante o cozimento de alimentos, um processo conhecido como **reação de Maillard ou reação de acastanhamento**. Os seres humanos foram descritos como fornos de baixa temperatura, operando a 37°C, com longos ciclos de cozimento (≈ 75 anos). Muitos dos produtos da reação de Maillard detectados na crosta de pães e de roscas têm sido identificados nos cristalinos e nos colágenos humanos e aumentam com a idade. (Veja também a discussão a respeito das complicações diabéticas no Capítulo 21.)

As teorias dos sistemas orgânicos do envelhecimento incorporam vários aspectos das anteriormente descritas. Essas teorias atribuem ao envelhecimento a falência dos sistemas integrativos, como o imunológico, o neurológico, o endócrino e o circulatório. Embora não seja apontada uma causa específica, essas teorias integram as teorias biológicas e químicas, reconhecendo tanto as contribuições genéticas quanto as ambientais.

A teoria do envelhecimento pelos radicais livres

A teoria do envelhecimento pelos radicais livres é a mais amplamente aceita

A teoria do envelhecimento pelos radicais livres (FRTA) trata o envelhecimento como resultado de um acúmulo do dano oxidativo às biomoléculas: DNA, RNA, proteínas, lipídios e glicoconjugados. Sob o ponto de vista da FRTA, os organismos de vida longa têm baixas taxas de produção de **espécies reativas de oxigênio** (**ROS**) (Cap. 37), melhores defesas antioxidantes e processos de reparo ou de taxa de renovação (*turnover*) mais eficientes. Embora seja uma teoria química, a FRTA não ignora a importância da genética e da biologia na limitação da produção das ROS e o papel dos mecanismos antioxidantes e de reparo. Essa teoria também se inter-relaciona com outras, como a teoria da taxa de sobrevivência (uma vez que a taxa de geração de ROS é uma função da taxa geral e/ou da

extensão do consumo de oxigênio) e a teoria da ligação cruzada entre proteínas (*crosslinking*), porque alguns produtos das ROS danificam esse tipo de ligação. Finalmente, como uma hipótese química, a FRTA não exclui o acúmulo do dano químico, independentemente das ROS, tal como a racemização e a desaminação de aminoácidos, mas mantém o foco nas ROS como a principal fonte de dano e a causa fundamental do envelhecimento.

A FRTA é sustentada pela correlação inversa entre a taxa de metabolismo basal (taxa de consumo de oxigênio por unidade de peso) e a expectativa de vida máxima de mamíferos, além da evidência de aumento de dano oxidativo às proteínas com a idade. Os grupamentos carbonil das proteínas, como o semialdeído glutâmico e o semialdeído α-aminoadípico formados pela desaminação oxidativa da arginina e da lisina, respectivamente, são formados em proteínas expostas às ROS. O nível do estado de equilíbrio de **proteínas carboniladas** em proteínas intracelulares aumenta de modo logarítmico com a idade e em uma taxa inversamente proporcional à expectativa de vida das espécies. Os fibroblastos de pacientes com **progeria** (envelhecimento acelerado), como, por exemplo, as síndromes de Werner e de Hutchinson-Gilford, apresentam mais proteínas carboniladas quando em comparação com os controles pareados à idade. Concentrações semelhantes de proteínas carboniladas também estão presentes em tecidos de ratos e de humanos idosos, sugerindo que alterações semelhantes ocorrem no envelhecimento em diversos organismos, independentemente da diferença de expectativa de vida.

A Figura 43.5 ilustra o acúmulo de dois produtos de oxidação de aminoácidos relativamente estáveis no colágeno da pele humana: **o sulfóxido de metionina e a ortotirosina**. Esses compostos são formados por mecanismos distintos envolvendo diferentes ROS (Cap. 37) e estão presentes em concentrações significativamente diferentes no colágeno da pele, porém aumentam de acordo com a idade. Outras modificações de aminoácido que se acumulam no colágeno da pele com a idade incluem os **produtos finais de glicosilação e de lipoxidação avançada (AGE/ALEs),** como a N^{ε}-(carboximetil)lisina (CML) e a pentosidina (Figs. 43.6 e Fig. 21.19), além do D-aspartato.

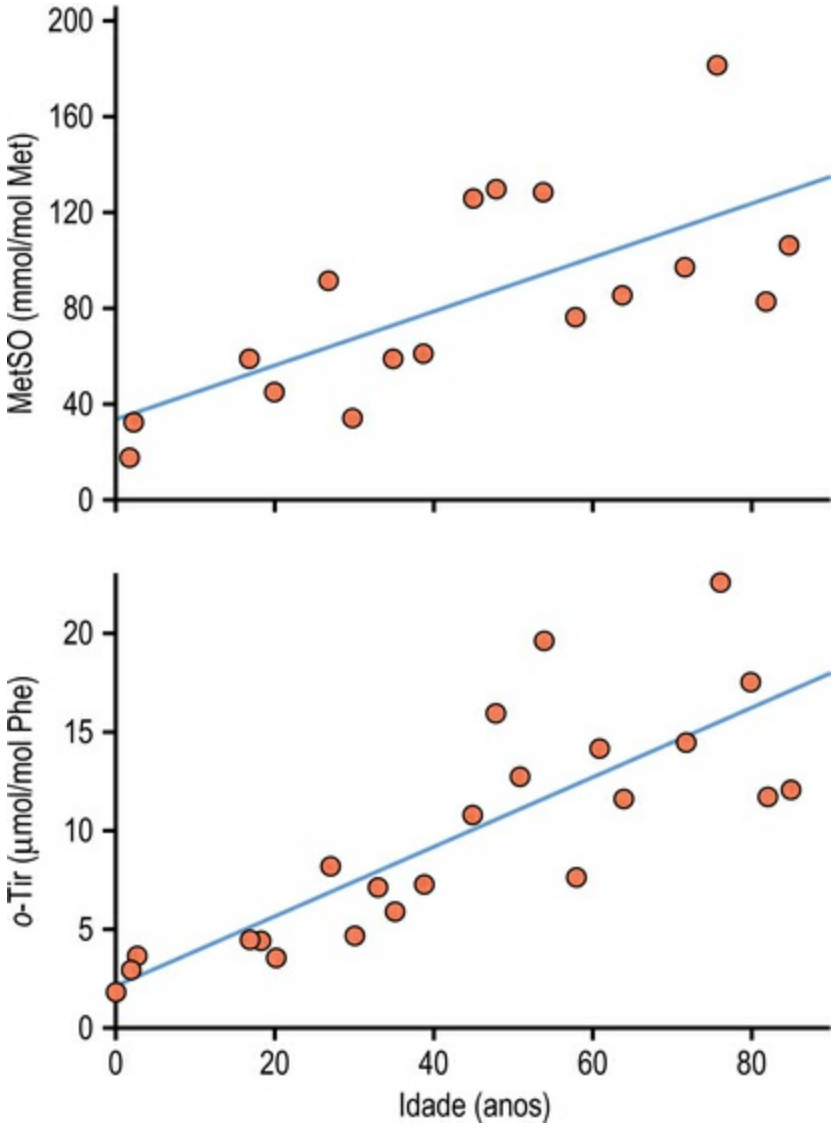


FIG. 43.5 Acúmulo de produtos de oxidação de aminoácidos no colágeno da pele humana com a idade. A metionina é oxidada em sulfóxido de metionina (MetSO) pelo HOCl ou H_2O_2; a *orto*-tirosina é um produto da adição do radical hidroxila à fenilalanina (Phe). Apesar de uma diferença de 100 vezes na sua taxa de acúmulo no colágeno, os níveis de MetSO e de o-tirosina se correlacionam fortemente um com o outro, indicando que múltiplas ROS contribuem para o dano oxidativo às proteínas (adaptado de Wells-Knecht MC et al. Age-dependent accumulation of ortho-tyrosine and methionine sulfoxide in human skin collagen is not increased in diabetes: evidence against a generalized increase in oxidative stress in diabetes. *J Clin Invest* 100:839-846, 1997).

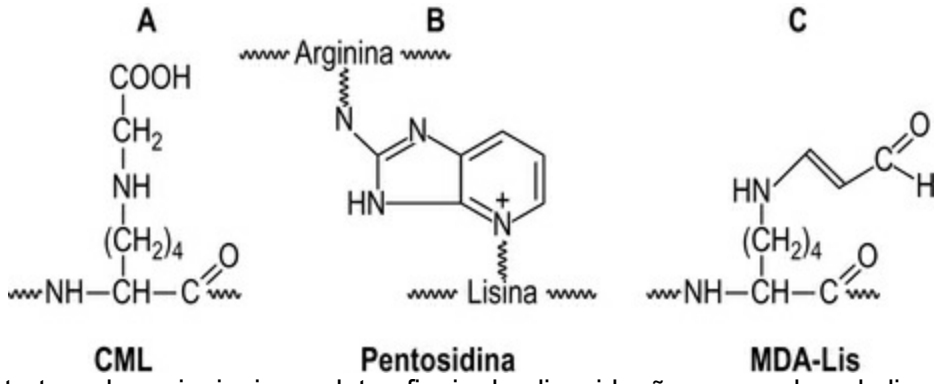


FIG. 43.6 Estrutura dos principais produtos finais de glicoxidação avançada e de lipoxidação (AGE/ALEs). **(A)** O AGE/ALE, N^{ε}-(carboximetil)lisina (CML), que é formado durante as reações de peroxidação tanto de carboidratos quanto lipídica. **(B)** O AGE, pentosidina, uma ligação cruzada fluorescente em proteínas. **(C)** O ALE, o malondialdeído-lisina (MDA-Lis), um ALE reativo que pode levar à formação de ligações cruzadas de aminoenimina (RNHCH = CHCH = NR) em proteínas.

Quadro clínico

Progerias: envelhecimento acelerado como resultado do defeito no reparo do DNA

Determinadas doenças genéticas são consideradas modelos de envelhecimento acelerado (progeria). Essas doenças monogênicas manifestam muitas, mas nunca todas, as características do envelhecimento normal. Poucos pacientes com progeria desenvolvem demência ou condições relacionadas com a idade, como a doença de Alzheimer. As progerias são algumas vezes descritas como caricaturas do envelhecimento, porém são modelos úteis para a compreensão do processo de envelhecimento.

As **síndromes de Werner e de Bloom** são doenças autossômicas recessivas causadas por mutações de genes distintos que atuam como helicases do DNA, que têm papéis específicos no reparo do DNA danificado. Os pacientes com a síndrome de Werner têm aparência normal durante a infância, mas param de crescer na adolescência. Gradualmente apresentam muitos sintomas de envelhecimento prematuro, incluindo o surgimento de cabelo acinzentado e queda de cabelos, afinamento da pele, desenvolvimento precoce de catarata, prejuízo da tolerância à glicose e diabetes, arteriosclerose e osteoporose, além de aumento nas taxas de câncer. O óbito normalmente ocorre entre os 40 e os 50 anos devido à doença cardiovascular. Os fibroblastos dos pacientes com síndrome de Werner dividem-se somente 20 vezes em cultura de células, em comparação com 60 nas células normais, e têm níveis mais altos de grupamentos carbonilas ligados às proteínas, um indicador de aumento de estresse oxidativo.

A síndrome de Bloom é caracterizada pelo aumento da frequência de quebras cromossômicas, nanismo, fotossensibilidade e aumento da frequência de câncer e de leucemia. O óbito normalmente ocorre entre os 20 e os 30 anos. A ocorrência de ataxia-telangiectasia ou síndrome do cromossomo frágil está associada ao aumento da perda

dos telômeros na divisão celular e na deficiência no reparo da quebra da dupla fita de DNA. Essa síndrome é causada por um defeito em uma proteína cinase envolvida na transdução de sinal, no controle do ciclo celular e no reparo do DNA.

A **síndrome de Hutchinson-Gilford** é uma forma de progeria pediátrica grave. Os pacientes apresentam muitos dos sintomas da síndrome de Werner, porém os sintomas surgem em idade mais precoce e o óbito geralmente ocorre entre os 20 e os 30 anos. Essa síndrome é causada por um defeito no gene da lamina, um componente do envelope nuclear. A síndrome de Hutchinson-Gilford é uma das diversas síndromes associadas à mutação da lamina, que causa um aumento na fragilidade nuclear e processamento aberrante do mRNA. Da mesma forma que na síndrome de Werner, a cultura de fibroblastos torna-se prematuramente senescente. Estas doenças progéricas ilustram a importância de um eficiente reparo do DNA para o normal crescimento e envelhecimento.

O **d-aspartato** é uma modificação não oxidativa da proteína que é formada pela racemização espontânea dependente da idade do L-aspartato, a forma natural do aminoácido nas proteínas. A taxa de renovação mais rápida da pele, quando em comparação com o colágeno articular, leva a uma taxa menor de acúmulo de d-aspartato no colágeno da pele com a idade e também explica a diferença nas taxas de acúmulo de AGE/ALEs na pele *versus* o colágeno articular. Os níveis de AGE/ALEs são até mais altos nas lentes do cristalino, que têm a menor taxa de renovação entre as proteínas do organismo. A **desaminação** da asparagina e da glutamina é outra modificação química não oxidativa em proteínas que aumenta com a idade, tendo sido principalmente descrita em proteínas intracelulares.

A taxa de acúmulo dessas modificações depende da taxa de renovação dos colágenos (Fig. 43.7) e é acelerada pela hiperglicemia e pela hiperlipidemia no diabetes e na aterosclerose. Acredita-se que o aumento de AGE/ALEs e a ligação cruzada oxidativa do colágeno prejudiquem a taxa de renovação e contribuam para o espessamento das membranas basais com a idade. O aumento dos níveis de AGE/ALEs no colágeno ajustados à idade está envolvido na patogênese das complicações do diabetes e da aterosclerose. Esses produtos também estão aumentados no tecido encefálico de diversas doenças neurodegenerativas, incluindo as doenças de Alzheimer, de Parkinson e de Creutzfeldt-Jakob (príon).

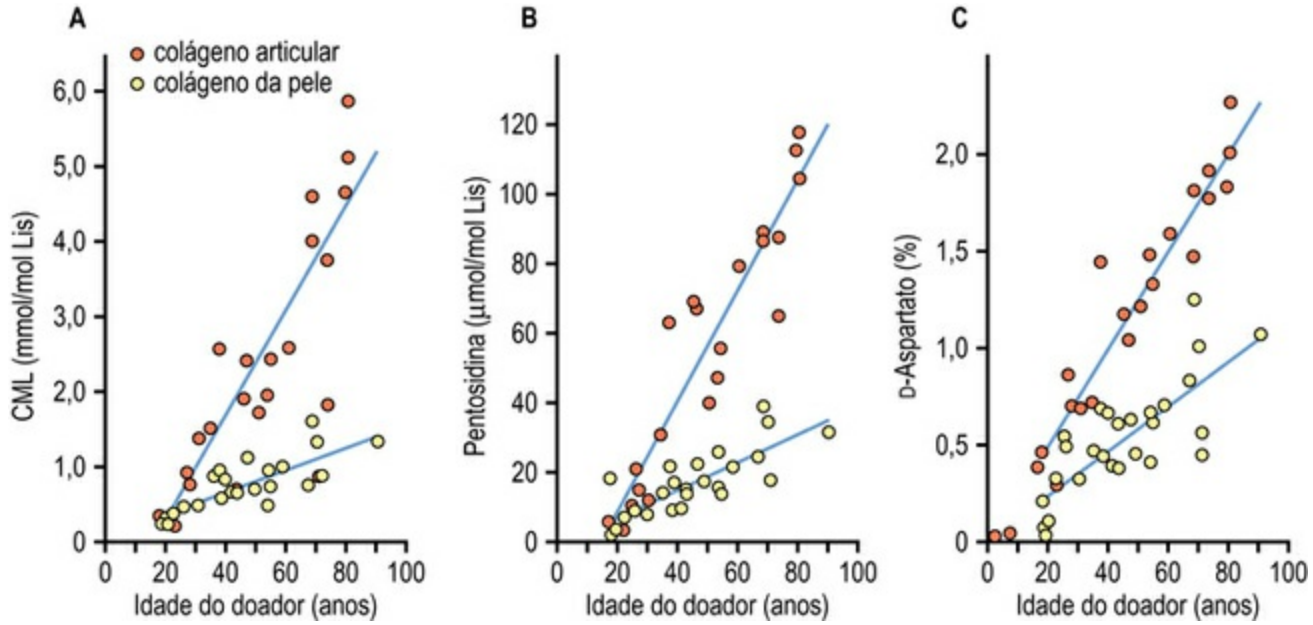


FIG. 43.7 Acúmulo de produtos finais de glicoxidação avançada e de lipoxidação (AGE/ALEs) e de d-aspartato nos colágenos articular e da pele com a idade. A N^{ε}-(carboximetil)lisina (CML) é formada por meio de mecanismos oxidativos a partir de proteínas glicadas ou de reações de glicose, ascorbato ou de produtos de peroxidação lipídica com proteínas. A ligação cruzada fluorescente pentosidina é formada pela reação oxidativa de glicose ou de ascorbato com proteínas. O d-aspartato é formado não oxidativamente por racemização de resíduos de l-aspartato em proteínas. Os níveis tissulares de biomarcadores oxidativos e não oxidativos se correlacionam uns com os outros, e as diferenças em suas velocidades de acúmulo nos colágenos articular e da pele resultam de diferenças nas velocidades de *turnover* desses colágenos (adaptado de Verzijl N et al: Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation endproducts. *J Biol Chem* 275:39027-39031, 2000).

Apesar de não tão bem caracterizado, o pigmento **lipofuscina** é um biomarcador característico do envelhecimento. Seu acúmulo ocorre na forma de grânulos fluorescentes, derivados de lisossomos no citoplasma de células pós-mitóticas, em uma taxa inversamente relacionada com a expectativa de vida das espécies. A lipofuscina é resultante do acúmulo de restos não digeridos decorrente de reações entre os peróxidos lipídicos e as proteínas. Ela pode representar 10%-15% do volume do músculo cardíaco e de células neuronais em idade avançada, e sua taxa de deposição nos miócitos cardíacos em cultura de células é acelerada pelo crescimento sob condições de hiperóxia. Nas moscas, a taxa de acúmulo da lipofuscina varia diretamente com a temperatura e a atividade do ambiente e inversamente à expectativa de vida, de forma consistente com os efeitos dessas variáveis na expectativa de vida (Fig. 43.2B).

Em resumo, existe uma grande variedade de modificações químicas, oxidativas e não oxidativas, que se acumulam em proteínas com a idade. Embora, com frequência, o foco da atenção seja a modificação da proteína, o dano real a partir dos radicais livres e do estresse oxidativo ocorre ao nível do genoma, uma vez que, se o DNA não for reparado corretamente, a célula morrerá, sua capacidade pode estar prejudicada ou o dano será propagado. O dano ao DNA se acumula não na forma de ácidos nucleicos modificados, mas como erros quimicamente "silenciosos" no reparo – inserções, deleções, substituições, transposições e inversões de sequências de DNA – que afetam a expressão e a estrutura das proteínas. Como o reparo é bem eficiente nos seres humanos quando em comparação com outros animais, e a composição do DNA não se altera com o reparo, as mutações do DNA não são detectáveis nos tecidos por meio de técnicas analíticas

convencionais. Entretanto, a presença, na urina, de pirimidinas e de purinas (Fig. 37.6) oxidadas fornece evidências de dano oxidativo crônico ao genoma.

Teorias mitocondriais do envelhecimento

O DNA mitocondrial é particularmente suscetível ao dano oxidativo

As teorias mitocondriais do envelhecimento são uma mistura das teorias biológicas e químicas, tratando o envelhecimento como resultado de um dano químico ao DNA mitocondrial (mtDNA). A mitocôndria contém proteínas especificadas tanto pelo DNA nuclear quanto pelo mitocondrial, mas somente 13 proteínas mitocondriais são codificadas pelo DNA mitocondrial. Embora possa parecer trivial, isso inclui subunidades essenciais das três bombas de prótons e da trifosfato de adenosina (ATP) sintase. O mtDNA é especialmente sensível a mutações: a mitocôndria é o principal local de produção de ROS na célula (Fig. 37.4), o mtDNA não é protegido por uma bainha de histonas e a mitocôndria possui capacidade limitada de reparo do DNA.



Quadro clínico

Biomarcadores de estresse oxidativo e do envelhecimento

Produtos finais de glicoxidação e de lipoxidação avançadas (AGE/ALEs) são formados pela reação de proteínas com produtos de oxidação de carboidratos e de lipídios (Fig. 43.6). Alguns compostos, como a N^{ε}-(carboximetil)lisina (CML), podem ser formados tanto a partir de carboidratos como de lipídios; outros, como a pentosidina, são formados exclusivamente a partir de carboidratos, enquanto o aducto de malondialdeído em resíduos de lisina é formado exclusivamente a partir de lipídios. As fontes de carboidratos de AGEs incluem a glicose, o ascorbato e os intermediários glicolíticos; os ALEs são derivados da oxidação de ácidos graxos poli-insaturados em fosfolípidios. Resíduos de lisina, histidina e cisteína são os principais sítios de formação de AGE/ALE em proteínas. Mais de 30 diferentes AGE/ALEs foram detectados em proteínas teciduais, e sabe-se que muitos deles aumentam com a idade. Os AGE/ALEs são biomarcadores úteis do envelhecimento de proteínas e de sua exposição ao estresse oxidativo.



Quadro clínico

Doença de alzheimer: estresse oxidativo em doenças neurodegenerativas

A doença de Alzheimer (AD) é a forma mais comum de deterioração cognitiva progressiva no idoso. Essa doença é caracterizada microscopicamente pelo surgimento de **emaranhados neurofibrilares** e de placas senis nas regiões corticais do cérebro. Os

emaranhados localizam-se dentro dos neurônios e são ricos em proteína τ (tau), a qual é derivada de microtúbulos, e que se encontra hiperfosforilada e poliubiquitinada. As placas são compostas de agregados extracelulares localizados em torno dos depósitos amiloides, formados a partir de peptídios insolúveis derivados de uma família de **proteínas precursoras amiloides**. A AD afeta principalmente os neurônios colinérgicos, e os fármacos que inibem a degradação da acetilcolina dentro das sinapses constituem a base do tratamento. Uma abordagem similar é utilizada na preservação da dopamina nos neurônios dopaminérgicos na doença de Parkinson, isto é, por meio da inibição de sua enzima de biotransformação, a monoamina oxidase.

Diversos estudos mostraram que tanto os AGEs quanto os ALEs estão aumentados nos emaranhados e nas placas no cérebro de pacientes com AD, quando em comparação com os controles pareados por idade. Outros indicadores de estresse oxidativo generalizado no cérebro de pacientes com AD incluem aumento dos níveis de proteínas carboniladas, nitrotirosina e 8-OH-deoxiguanosina, sendo que todos esses marcadores são detectados por métodos imuno-histoquímicos. A proteína amiloide é tóxica para os neurônios em cultura celular e catalisa respostas de estresse oxidativo e inflamatórias em células gliais. Quantidades significativas de ferro descompartimentalizado, ativo do ponto de vista redox e um catalisador das reações de Fenton (Cap. 27), são também histologicamente detectáveis no cérebro, na AD e podem ser reversivelmente removidas (*in vitro*) por tratamento com quelantes, como a desferroxamina. Com base nesses dados, o estresse oxidativo é fortemente envolvido no desenvolvimento e/ou na progressão da AD, e o uso de quelantes está sendo clinicamente avaliado em seu tratamento. Estudos epidemiológicos também indicam que o tratamento de longo prazo com fármacos anti-inflamatórios não esteroidais, como o ibuprofeno e o acetaminofeno, podem reduzir o risco de AD e retardar seu início ou sua progressão.

As **doenças mitocondriais** normalmente envolvem defeitos no metabolismo energético, incluindo complexo piruvato desidrogenase, piruvato carboxilase, complexos transportadores de elétrons, ATP sintase e enzimas de biossíntese de ubiquinona. Esses defeitos podem ser causados por mutações tanto no DNA nuclear quanto no mitocondrial, mas o mtDNA sofre muito mais mutações do que o DNA nuclear. Esses defeitos frequentemente resultam no acúmulo de ácido lático devido ao prejuízo da fosforilação oxidativa e podem causar morte celular, especialmente nos músculos esquelético (miopatias), cardíaco (cardiomiopatias) e nos nervos (encefalopatias), todos os quais são fortemente dependentes do metabolismo oxidativo. O número de mitocôndrias e as múltiplas cópias do genoma mitocondrial na célula podem fornecer alguma proteção contra a disfunção mitocondrial como resultado da mutação, mas a perda total da função da mitocôndria, e, algumas vezes, do número de mitocôndrias, é um padrão característico do envelhecimento.



Quadro de conceitos avançados

Envelhecimento do sistema circulatório

A **matriz extracelular** da aorta e das principais artérias torna-se mais espessa e com mais ligações cruzadas com a idade, contribuindo tanto para a diminuição da elasticidade quanto da habilidade do endotélio em dilatar os vasos sanguíneos em resposta aos estímulos físicos e químicos. Essas alterações ocorrem naturalmente com a idade, independentemente da doença, mas podem contribuir para o aumento do risco cardiovascular do idoso. Os AGEs e os ALEs estão envolvidos na ligação cruzada da matriz extracelular vascular, explicando o aumento relacionado com a idade da ligação cruzada arterial no diabetes e na dislipidemia. Aumentos dos AGE/ALEs e das ligações cruzadas entre proteínas estão também implicados na alteração das propriedades de filtração da membrana basal glomerular renal no diabetes.

Modelos genéticos de aumento da expectativa de vida

O efeito da genética na longevidade rapidamente aparece nos modelos animais

Diferentes linhagens de camundongos variam em mais de duas vezes em relação à expectativa de vida, e existem também diferenças significativas na expectativa de vida de camundongos machos e fêmeas da mesma linhagem criados em condições idênticas. Deficiências em determinados hormônios ou defeitos em seus receptores ou nas vias de sinalização pós-receptor têm um efeito significativo na expectativa de vida de camundongos. Os efeitos mais marcantes são observados nos camundongos anões das linhagens Ames e Snell. Esses camundongos têm defeitos hipofisários diferentes, ambos resultando em secreção insignificante do hormônio do crescimento (GH), que estimula a secreção de fator de crescimento 1 semelhante à insulina (IGF-1) pelo fígado, do hormônio tireoestimulante e de prolactina (Cap. 39). Ocorre diminuição do peso corpóreo de adultos jovens em aproximadamente 35% e sua expectativa de vida máxima aumenta em cerca de 45% quando em comparação com os controles; porém, estranhamente, eles se tornam obesos com a idade. Efeitos semelhantes no peso e na expectativa de vida são observados em camundongos com defeitos em receptores de GH ou de IGF-1 ou na transdução de sinal. Muitas dessas linhagens são frágeis: os anões Ames ou Snell apresentam hipotireoidismo, hipoglicemia, hipoinsulinemia e baixa temperatura corpórea. Esses camundongos têm baixa capacidade reprodutiva, são mais suscetíveis às infecções e necessitam de condições de habitação especiais para manter a temperatura corpórea, mas vivem mais tempo. O tratamento do hipotireoidismo nos anões Snell levou à restauração de uma expectativa de vida quase normal, embora a hipofisectomia de ratos jovens aumente sua expectativa de vida máxima em 15-20%. Assim, três hormônios que possuem efeito marcante no metabolismo e no crescimento **(GH, IGF-1 [e insulina] e tiroxina)** também têm efeitos importantes na expectativa de vida.



Quadro de conceitos avançados

Telômeros: um relógio do envelhecimento

Os telômeros são sequências repetitivas localizadas nas extremidades do DNA cromossômico, tipicamente compostas de centenas de cópias de pequenas repetições de DNA altamente redundantes, que no ser humano é TTAGGG (Cap. 32). A DNA polimerase necessita de um molde de dupla fita para replicação; iniciadores (*primers*) de RNA na porção final 5′ do molde servem para dar início à síntese de DNA. Entretanto, na extremidade final dos cromossomos, a síntese de DNA é limitada, uma vez que não existem sequências adicionais que sirvam para dar continuidade à ação da DNA primase. Assim, cada ciclo de replicação cromossômica resulta em um encurtamento do cromossomo. A enzima telomerase é uma transcriptase reversa que contém RNA com uma sequência complementar à do DNA dos telômeros. Sua função é manter o comprimento dos telômeros na porção 3′ dos cromossomos. A telomerase é encontrada em tecidos fetais, células germinativas adultas e células tumorais, porém as células somáticas de organismos multicelulares não têm atividade telomerase. Isso levou à hipótese de que o encurtamento dos telômeros pode contribuir para o limite de Hayflick e de que está envolvido no envelhecimento dos organismos multicelulares. O aumento da expressão da telomerase em células humanas resulta no alongamento dos telômeros e no aumento da longevidade dessas células em pelo menos 20 duplicações celulares. As células de indivíduos com doenças de envelhecimento prematuro (progeria) também têm encurtamento dos telômeros. Ao contrário, as células cancerosas, que são imortais, expressam uma atividade telomerase ativa. Todas essas observações sugerem que a diminuição do comprimento dos telômeros está associada à senescência celular e ao envelhecimento. Camundongos *knockout*, nos quais o gene telomerase foi deletado, têm cromossomos com falta de telômeros detectáveis. Esses camundongos têm alta frequência de aneuploidia e de anormalidades cromossômicas. A doença disceratose congênita autossômica é caracterizada por mutação no lócus da telomerase, que leva à incapacidade das células somáticas em reconstituir seus telômeros, o que acarreta a perda da epiderme e da medula hematopoiética. Essa doença tem muitas das características do envelhecimento acelerado.

Em humanos, o determinante genético mais significativo para a expectativa de vida é o gênero: as mulheres vivem mais do que os homens. A genética responde por aproximadamente 20-50% da variabilidade restante da expectativa de vida, e os outros 50-80% são atribuídos ao ambiente e às variações aleatórias de desenvolvimento. Estima-se que (em 2008) existam menos de 30 genes que têm efeito significativo na expectativa de vida humana. Os cruzamentos entre as populações humanas e as diversas combinações alélicas desses genes podem ofuscar os efeitos observados em linhagens cossanguíneas de vermes ou de roedores. Entretanto, existe um relato recente de que judeus ashkenazi que vivem além dos 95 anos tenham maior frequência de mutações no gene do receptor de IGF-1 (IGF-1R). Existem outros genes ou produtos de genes que estão associados ao aumento da longevidade em humanos – por exemplo, variantes de ApoE, ApoC3 e CETP –; entretanto, esses genes parecem aumentar a expectativa de vida média, provavelmente

pela modulação dos efeitos cardiovasculares do colesterol da dieta, em vez de causar aumento na expectativa de vida máxima.

Quadro de conceitos avançados

Envelhecimento do músculo: dano ao DNA mitocondrial

A idade avançada é caracterizada por uma diminuição generalizada da massa e da força da musculatura esquelética (sarcopenia), como resultado da redução tanto do número de neurônios motores quanto do número e do tamanho das fibras musculares. A perda das fibras é acompanhada de um aumento do tecido conectivo fibroso intersticial e da redução da densidade capilar, que limita o suprimento de sangue. A diminuição da massa e da força muscular contribui para a fragilidade e o aumento do risco de mortalidade. A perda da massa da musculatura esquelética também pode contribuir para a intolerância à glicose no idoso como resultado da diminuição da massa de tecido disponível para captar glicose do sangue.

Uma das principais alterações na bioquímica do músculo, com a idade, é o aumento no número das células musculares com mitocôndrias deficientes em citocromo oxidase, o que limita a capacidade de trabalho do músculo. Com a diminuição da eficiência da mitocôndria em oxidar o dinucleotídio de nicotinamida e adenina (NADH), elas se tornam mais reduzidas, e o acúmulo de ubiquinona (semiquinona) parcialmente reduzida promove a redução do oxigênio molecular, levando ao aumento da produção do ânion superóxido na mitocôndria mais velha (Cap. 37). Sob essas condições, quando a fosforilação oxidativa está prejudicada, as células parecem gerar ATP principalmente por glicólise. O NADH também é oxidado extramitocondrialmente, principalmente pelas NADH oxidases na membrana plasmática, que produzem peróxido de hidrogênio, mas não ATP.

$$\text{NADH oxidase} : \text{NADH} + \text{H}^+ + \text{O}_2 \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}_2$$

Essas alterações são observadas tanto no músculo cardíaco quanto no esquelético e parecem resultar de deleções aleatórias importantes no DNA mitocondrial (25-75% de mtDNA total), que é então amplificado pela expansão clonal, levando à atrofia e à fragmentação da fibra. A força da fibra muscular corresponde à sua conexão mais fraca, de tal forma que a perda de pequenas regiões da fibra afeta a capacidade total do músculo. Felizmente, a sarcopenia pode ser retardada e parcialmente revertida pelo exercício de resistência; por isso a ênfase no exercício regular entre os idosos.

Intervenções antienvelhecimento – o que funciona e o que não funciona

Suplementos antioxidantes

Os suplementos antioxidantes podem melhorar a saúde, mas não aumentam o tempo de vida

Com base na FRTA parece razoável especular que a suplementação antioxidante deve ter um efeito na longevidade. Na verdade, entretanto, não existe evidência experimental rigorosa, reprodutível, de que os suplementos antioxidantes tenham qualquer efeito na expectativa de vida máxima em humanos ou em outros vertebrados. Ao mesmo tempo, os suplementos antioxidantes, a maior parte dos quais inclui vitaminas, podem melhorar a saúde, particularmente nos indivíduos com deficiências vitamínicas. Assim, espera-se que ocorra algum efeito da terapia antioxidante na expectativa de vida média (e saudável). A impossibilidade de se atingir a expectativa de vida máxima pode resultar do fato de que existem muitos mecanismos para a produção e o controle de radicais livres e para a inibição e a reversão do dano em biomoléculas. Muitos desses processos dependem da atividade de enzimas que detoxificam as ROS ou regeneram antioxidantes endógenos. Essas enzimas, como a superóxido dismutase e a glutationa peroxidase (Cap. 37), são induzidas como resposta ao estresse oxidativo e também podem estar reprimidas em momentos em que ele se encontra baixo. Assim, o organismo pode responder a fim de manter um balanço homeostático entre as forças pró e antioxidantes (Fig. 37.2), empreendendo esforços para aumentar as defesas antioxidantes. Essa resposta é essencial, por exemplo, na manutenção da atividade bactericida eficaz durante o *burst* respiratório que acompanha a fagocitose.

Restrição calórica

A restrição calórica é o único regime conhecido para aumentar o tempo de vida em animais

A restrição calórica (CR) é a única intervenção que estende de forma consistente a expectativa de vida máxima em uma variedade de espécies, incluindo os mamíferos, os peixes, as moscas, os vermes e as leveduras. A redução do consumo calórico total é a característica essencial dessa intervenção, isto é, os efeitos benéficos na extensão da expectativa de vida são observados sempre que a CR é aplicada, independentemente da composição dietética, apesar de a intervenção precoce e prolongada ter efeitos mais expressivos. Conforme demonstrado na Figura 43.8, a CR leva a um aumento significativo, tanto da expectativa de vida média quanto da máxima de ratos de laboratório, equivalente ao aumento da expectativa de vida humana em cerca de 180 anos. Ratos sob restrição calórica têm menos fibras musculares com falta de citocromo oxidase e níveis diminuídos de deleções no DNA mitocondrial muscular. Camundongos sob restrição calórica também têm níveis mais baixos de genes induzíveis para a

detoxificação hepática, para o reparo do DNA e para a resposta ao estresse oxidativo (proteínas de choque térmico), sugerindo menor taxa de estresse oxidativo e dano às proteínas e ao DNA.

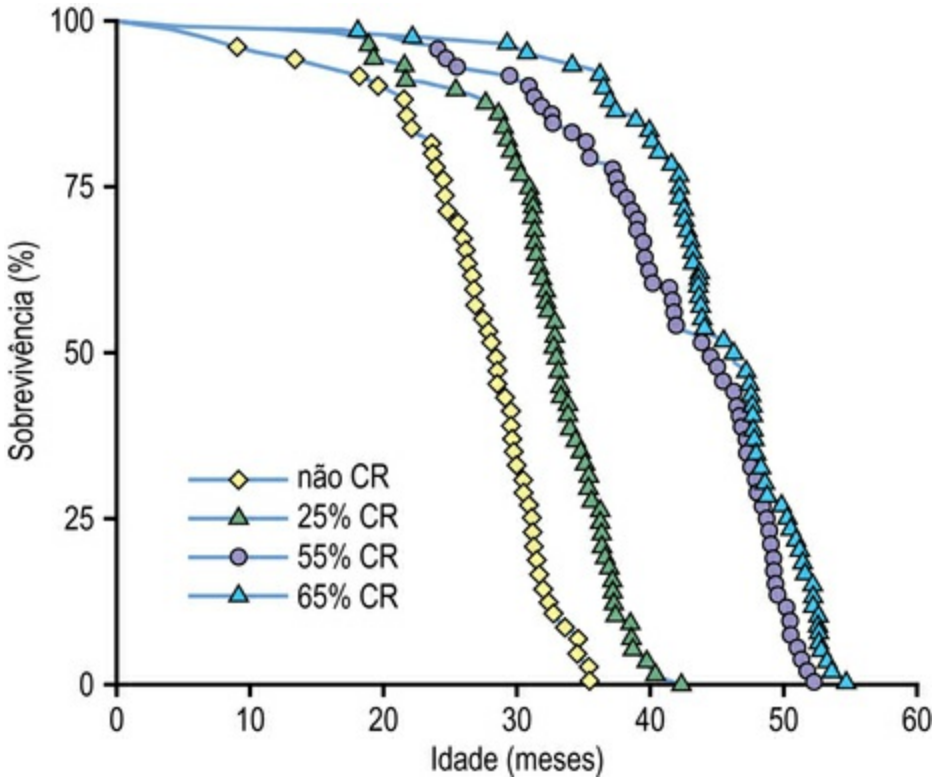


FIG. 43.8 A restrição calórica (CR) aumenta a longevidade em camundongos. O grupo não CR recebeu alimento *ad libitum*. Outros grupos tiveram restrição de 25, 55 e 65% da dieta *ad lib*, iniciando-se no primeiro mês de vida (adaptado de Weindruch R et al: Retardation of aging in mice by dietary restriction. J Nutr 116:651-654, 1986).

A restrição calórica retarda o início de doenças relacionadas com a idade, incluindo o câncer (Fig. 43.9)

A CR é a intervenção de prevenção ao câncer mais potente e de ampla ação em roedores. Argumenta-se que o aumento da expectativa de vida máxima pela CR é alcançado pelo retardo do início do câncer. Animais de vida longa são mais eficientes na proteção de seu genoma, assim retardando o início do câncer, porém a CR pode limitar ainda mais o dano, prevenindo a integridade do genoma e, portanto, levando a uma maior expectativa de vida. Embora a CR a longo prazo não tenha sido testada em humanos, a obesidade, no extremo oposto do espectro de peso, é um estado pró-inflamatório e um fator de risco para o câncer em humanos.

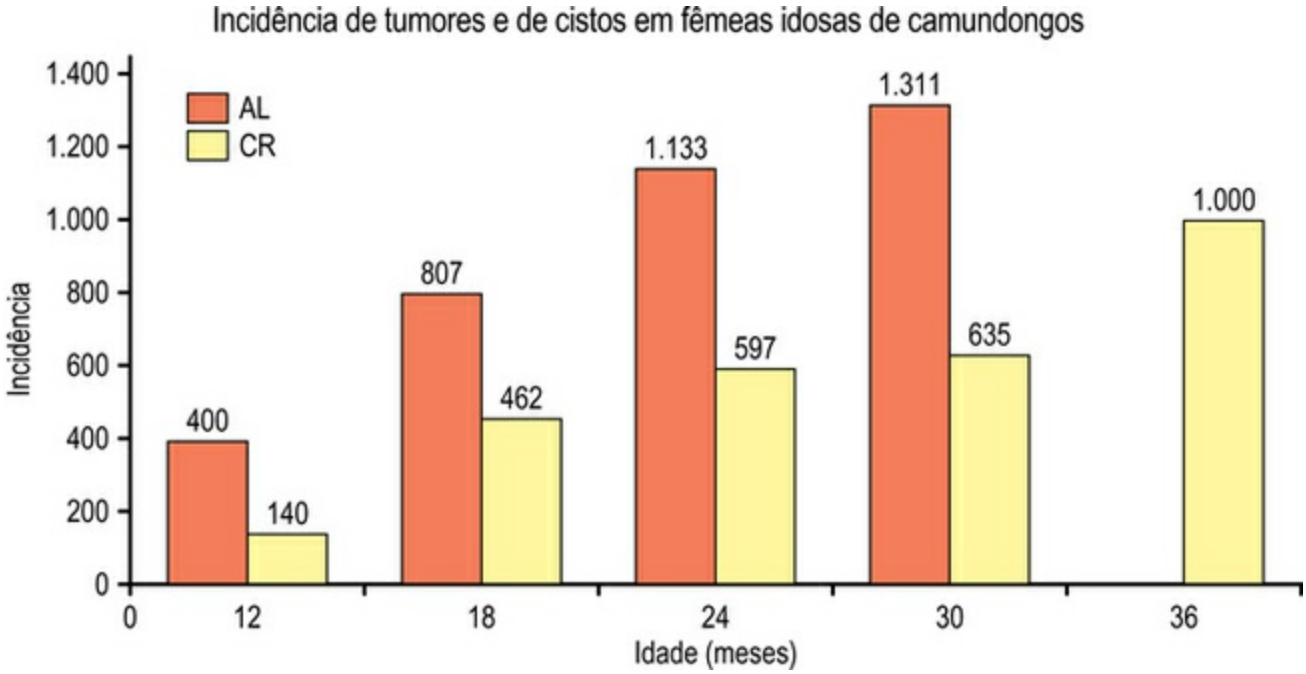


FIG. 43.9 Efeito da restrição calórica (CR) no desenvolvimento de tumores em camundongos. Mais de 1.000 camundongos, na proporção de 50:50 entre machos e fêmeas, de quatro genótipos diferentes foram divididos em dois grupos, um alimentado *ad libitum* (AL), outro recebendo 60% da ingestão calórica do grupo controle (CR), mas com ingestão comparável de vitaminas, minerais e micronutrientes. Coortes de animais foram eutanasiadas em tempos específicos, e as lesões totais (tumores mais cistos) foram medidas. Aos 24 meses, 51% dos camundongos AL e 13% dos CR tinham tumor. Observe a ausência de tumores nos camundongos controle aos 36 meses – todos os camundongos controle estão mortos. A CR aumentou a expectativa de vida média e máxima dos camundongos e também retardou o início do câncer (adaptado de Bronson RT, Lipman RD: Reduction in rate of occurrence of age related lesions in dietary restricted laboratory mice. *Growth Dec Aging* 55:169-184, 1991).

Nos experimentos de CR, tem sido difícil diferenciar entre os efeitos da restrição da dieta no gasto de energia (taxa de sobrevida) *versus* a redução do peso corpóreo ou da massa de tecido adiposo que acompanha a restrição calórica. Os camundongos FIRKO (*knockout* para os receptores de insulina no tecido adiposo) têm uma diminuição de 15-25% da massa corpórea, principalmente em função da diminuição de 50% da massa gorda. Entretanto, esses camundongos consomem quantidades idênticas de alimento por dia quando em comparação com o grupo controle; na verdade, mais do que os animais controle quando normalizados pelo seu peso corpóreo. Eles também têm um aumento de 20% na expectativa de vida, sugerindo que a diminuição da massa corpórea ou de gordura é mais importante do que o consumo calórico na determinação da expectativa de vida potencialmente máxima. Em outro estudo, a superexpressão da enzima de gliconeogênese, a PEPCK, no músculo esquelético produziu um camundongo mais magro, com 50% do peso corpóreo e 10% de massa gorda, quando em comparação com o grupo controle. Esses camundongos foram sete vezes mais ativos e comeram 60% mais do que os controles, mas viveram mais tempo e tiveram vida reprodutiva mais longa. De forma geral, a diminuição do peso corpóreo ou da adiposidade durante a CR, em vez de levar a uma diminuição do consumo de alimento, parece ter seu maior efeito no aumento da expectativa de vida. Um resultado geral desses experimentos alimentares e genéticos é que a eficiência mitocondrial, medida como menor taxa de produção de ROS/ATP, parece ser um importante determinante de longevidade.

Estudos sobre a CR em espécies de primatas mais longevas têm sido conduzidos desde

a década de 1980. A partir desses estudos se obteve evidência clara de que os macacos sujeitos a CR são mais ativos e de aparência mais jovem, têm melhores perfis de sensibilidade à insulina e de lipídios plasmáticos e risco diminuído de diabetes, melhor saúde cardiovascular e renal global, experimentam menor sarcopenia e atrofia cerebral associadas à idade e têm risco diminuído de câncer, em comparação com animais com alimentação normal e da mesma idade. No entanto, a evidência de extensão do tempo de vida é fraca e ainda controversa (Fig. 43.10). Mesmo tendo a CR sido demonstrada como capaz de aumentar o tempo de vida em macacos, é improvável que os humanos sejam capazes de adotar o restrito controle dietético necessário a este regime. Contudo, foram observadas melhoras similares na saúde em estudos a mais curto prazo, ou seja, melhora da glicose em jejum, da sensibilidade à insulina e do perfil lipídico plasmático, e pressão arterial diminuída, em comparação com um grupo controle equivalente. A compreensão dos mecanismos biológicos dos efeitos da CR poderá conduzir a estratégias alternativas que mimetizem a CR e possivelmente estendam, pelo menos, o tempo de vida saudável dos humanos.



FIG. 43.10 Efeitos da restrição calórica em primatas. O animal à esquerda foi criado em restrição calórica, enquanto o da direita foi alimentado com uma dieta normal. Um estudo da University of Wisconsin, em 2009, concluiu que a restrição calórica aumentou o tempo de vida de macacos Rhesus, enquanto outro, dos US National Institutes of Health, em 2012, também com macacos Rhesus, concluiu não haver efeito. Estudos com outras espécies de primatas continuam em curso, pelo que o assunto não está ainda completamente esclarecido; porém, é claro em todos os estudos que a restrição calórica produz um fenótipo mais saudável, com menos doenças crônicas relacionadas com a idade e risco de câncer diminuído (com permissão dos National Institutes of Health).

Resumo

- O envelhecimento é caracterizado por um declínio gradual da capacidade dos sistemas fisiológicos, levando à falência de um sistema crítico e à morte.
- Em nível bioquímico, o envelhecimento é considerado o resultado da modificação química crônica de todas as classes de biomoléculas.
- De acordo com a teoria do envelhecimento pelos radicais livres, as ROS são os principais responsáveis, causando alterações na sequência do DNA (mutações) e da estrutura de proteínas. A longevidade é alcançada pelo desenvolvimento de sistemas eficientes para limitar e/ou reparar o dano químico.
- A restrição calórica é, atualmente, o único mecanismo amplamente aplicado para retardar o envelhecimento e aumentar a expectativa de vida média, saudável e máxima das espécies.
- A CR parece funcionar, em parte, inibindo a produção de ROS e limitando o dano às biomoléculas, retardando muitos dos aspectos característicos do envelhecimento, incluindo o câncer.

Questões para aprendizagem

1. Discuta a natureza das proteínas carboniladas e da lipofuscina, além de sua relevância para o envelhecimento.
2. Discuta a importância relativa do dano químico às proteínas e ao DNA durante o envelhecimento.
3. Reveja a literatura recente a respeito dos modelos genéticos em camundongos referentes ao envelhecimento de mamíferos e discuta a correlação entre taxa de crescimento, obesidade, restrição calórica e envelhecimento em camundongos.
4. Foi identificada quase uma dúzia de genes que, quando sofrem mutação, aumentam a expectativa de vida dos animais. Por que os genes sem mutação são preservados no *pool* de genes?
5. Discuta as evidências de que a restrição calórica aumenta a expectativa de vida média, saudável e máxima de primatas.

Leituras sugeridas

Baur, J. A., Ungvari, Z., Minor, R. K., et al. Are sirtuins viable targets for improving healthspan and lifespan? *Nat Reviews*. 2012; 11:443–461.

Cefalu, C. A. Theories and mechanisms of aging. *Clin Geriatr Med*. 2011; 27:491–506.

Dai, D. F., Rabinovitch, P. S., Ungvari, Z. Mitochondria and cardiovascular aging. *Circ Res*. 2012; 110:1109–1124.

Ford, E. S., Zhao, G., Tsai, J., et al. Low-risk lifestyle behaviors and all-cause mortality: finding from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) III Mortality Study. *Am J Public Health*. 2011; 101:1922–1929.

Jenny, N. S. Inflammation in aging: cause, effect, or both? *Discov Med*. 2012; 13:451–460.

Kemnitz, J. W. Calorie restriction and aging in nonhuman primates. *ILAR J*. 2011; 52:66–77.

Libert, S., Guarente, L. Metabolic and neuropsychiatric effects of calorie restriction and sirtuins. *Annu Rev Physiol*. 2013; 75:669–684.

Semba, R. D., Nicklett, E. J., Ferrucci, L. Does accumulation of advanced glycation end products contribute to the aging phenotype? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2010; 65:963–975.

Sites

Caloric restriction, www.crsociety.org

Lecture notes on gerontology:

www.pathguy.com/lectures/aging.htm

www.benbest.com/lifeext/aging.html

Progeria: www.progeriaresearch.org/index.html

Telomeres: www.telomeres.net/

APÉNDICE 1

Intervalos de Referência Laboratoriais Clínicos Selecionados

Yee Ping Teoh and Marek H. Dominiczak

Intervalos de referência

Os intervalos de referência são valores de uma determinada substância (analito) obtidos em uma população de referência, normalmente um grupo de indivíduos saudáveis

Esses valores representam as quantidades fisiológicas de uma substância esperadas em pessoas saudáveis. O termo "intervalo de referência" é preferível em detrimento de "intervalo normal" porque, embora a população de referência possa ser claramente definida, não existe uma definição clara do que é "normal" no sentido clínico.

O desvio acima ou abaixo do intervalo de referência pode ser associado a um processo patológico, e a gravidade do processo patológico pode estar associada à magnitude do desvio. A população de referência ideal é aquela apropriada para a idade, o sexo e a etnia do indivíduo. O intervalo de referência pode também variar com o instrumento e o procedimento do ensaio usados para a medição.

Distribuição de valores em uma população de referência

Quando os dados de uma grande coorte de indivíduos saudáveis correspondem a uma distribuição gaussiana, os limites de referência são definidos como dois desvios padrão acima e abaixo da média

Isso constitui o intervalo central de 95% da distribuição. No entanto, muitas distribuições de analitos são não gaussianas. Assim, estes valores são em geral transformados matematicamente (p. ex., transformação logarítmica, recíproca, exponencial) para se obter uma distribuição gaussiana.

Interpretação de resultados laboratoriais de modo individual

A interpretação dos resultados dos testes laboratoriais baseia-se na comparação com valores de referência

Se um valor está fora do intervalo de referência, isso significa que — com uma probabilidade de 95% — o resultado é diferente do da população de referência. Vale salientar que isso não significa necessariamente que é anormal: por definição, 5% dos indivíduos em uma população de referência (1 em cada 20 indivíduos) terão resultados fora do intervalo de referência. No entanto, quanto mais longe o resultado estiver do intervalo de referência, maior é a probabilidade de este estar associado a uma patologia.

Limites de decisão clínica

Em alguns casos, em vez dos valores de referência, os limites de decisão clínica são a base para a interpretação

Os limites de decisão clínica são utilizados na interpretação de testes, como as dosagens da glicose plasmática, de lipídios e da troponina cardíaca. Esses limites, ou pontos de corte, costumam ser derivados de estudos epidemiológicos que relacionam os níveis de um analito com o risco de uma determinada condição.

Os valores de referência aqui fornecidos são retirados dos Intervalos de Referência da UK Pathology Harmonization e do menu de testes do Serviço de Bioquímica Clínica do NHS Greater Glasgow and Clyde (Reino Unido). Nas tabelas a seguir, incluímos apenas os testes básicos que serão úteis na interpretação da informação apresentada nos Quadros Clínicos ao longo deste livro. Nas Leituras Sugeridas o leitor encontrará listas completas de testes oferecidos em laboratórios clínicos.

Os intervalos de referência são apresentados no SI e em unidades convencionais, sempre que possível com o fator de conversão do SI para unidades convencionais.

- Para converter uma unidade SI em uma unidade convencional, multiplique pelo fator de conversão.
- Para converter uma unidade convencional para uma unidade SI, divida pelo fator de conversão.
- A não ser que seja indicado, os intervalos apresentados aplicam-se a concentrações séricas/plasmáticas.

Estes valores são fornecidos **apenas para efeitos de orientação**. Lembre-se de que os intervalos de referência podem ser diferentes em laboratórios diferentes. Antes de interpretar testes laboratoriais em uma situação clínica, é essencial verificá-los no laboratório local. Além disso, precisamente como pretendem ilustrar os Quadros Clínicos, **os testes laboratoriais devem ser sempre interpretados no contexto da história médica e do exame físico**.

Essa orientação mais recente (publicada em novembro de 2013) oferece recomendações atualizadas sobre o uso de estatinas para diminuir o risco de eventos cardiovasculares ateroscleróticos. Ela recomenda que as pessoas com doença aterosclerótica clínica sejam tratadas independentemente da concentração plasmática de LDL-colesterol. Por outro lado, o início do tratamento baseia-se no LDL-colesterol pré-tratamento: a terapia deve ser iniciada quando o LDL-colesterol se igualar ou exceder os 4,4 mmol/L (190 mg/dL). Pessoas com diabetes melito e com um risco global de evento a 10 anos igual ou superior

a 7,5% devem ser tratadas a níveis de LDL entre 1,8 mmol/L (70 mg/dL) e 4,3 mmol/L (169 mg/dL).

A maior alteração comparativamente com as orientações anteriores é que esta não recomenda mais o tratamento para um "nível-alvo" específico de LDL-colesterol. Em vez disso, sugere dois regimes de estatinas, instituídos dependendo do risco do evento e do risco de efeitos secundários: um regime terapêutico de elevada intensidade que baixa o LDL-colesterol em 50% ou mais, e um tratamento de intensidade moderada, reduzindo em 30-50% o LDL-colesterol. Consulte a referência anterior para mais detalhes.

Tabela 1

Gases sanguíneos

Analito	Unidades SI	Fator de conversão (SI para unidades convencionais)	Unidades convencionais
pH arterial		Logaritmo negativo da atividade do íon H^+	7,35-7,45
Atividade do íon H^+	35-45 nmol/L		
Pressão parcial do oxigênio arterial (PaO_2)	10,5-13,5 kPa	7,5	79-101 mmHg
Pressão parcial do dióxido de carbono arterial ($PaCO_2$)	4,6-6,0 kPa	7,5	34-45 mmHg

Tabela 2

Eletrólitos e marcadores séricos da função renal

Analito	Unidades SI	Fator de conversão (SI para unidades convencionais)	Unidades convencionais
Sódio	133-146 mmol/L	1,0	133-146 mEq/L
Potássio	3,5-5,3 mmol/L	1,0	3,5-5,3 mEq/L
Cloreto	95-108 mmol/L	1,0	95-108 mEq/L
Bicarbonato	22-29 mmol/L	1,0	22-29 mEq/L
Hiato aniônico [$(Na^+ + K^+) - (HCO_3^- + Cl^-)$]	12-16 mmol/L	1,0	12-16 mEq/L
Ureia	2,5-7,8 mmol/L	6,02	15,2-47 mg/dL
Creatinina	44-80 μmol/L	0,0113	0,50-0,90 mg/dL
Cálcio (ajustado para a albumina sérica)	2,20-2,60 mmol/L	4,0	8,8-10,4 mg/dL
Fosfato	0,8-1,5 mmol/L	3,1	2,5-4,7 mg/dL
Magnésio	0,7-1,0 mmol/L	2,43	1,7-2,4 mg/dL
Osmolalidade sérica	275-295 mmol/kg	1,0	275-295 mOsm/kg

Tabela 3

Proteínas séricas e testes de função hepática

Analito	Unidades SI	Fator de conversão (SI para unidades convencionais)	Unidades convencionais
Proteínas séricas			
Proteína total	60-80 g/L	0,1	6-8 g/dL
Albumina	35-50 g/L	0,1	3,5-5,0 g/dL
Globulinas	20-35 g/L Valor calculado (albumina) [Globulinas] = [Proteína total]–[Albumina]	0,1	2,0-3,5 g/dL
Proteína C-reativa (PC-R)	<10 mg/L		
Testes da função hepática			
Bilirrubina	<0,21 μmol/L	0,058	<1,2 mg/dL
Fosfatase alcalina em adultos	*		50-140 U/L
Alanina aminotransferase (ALT)	*		Homens 10-40 U/L Mulheres 7-35 U/L
Aspartato aminotransferase (AST)	*		Homens 15-40 U/L Mulheres 13-35 U/L
γ-glutamil transferase (GGT)	*		Homens <90 U/L Mulheres <50 U/L

1 U = 1/60 micro katal = 16,67 nanokatal.

No entanto, o katal não é utilizado atualmente na prática clínica. Desse modo, de acordo com a prática corrente, a atividade enzimática tem sido expressa em unidades por litro (U/L) ao longo deste livro.

*A unidade SI da atividade enzimática é o katal. Um katal é a quantidade de enzima que converte um mol de substrato por segundo (mol/s). O fator de conversão de U/L para katal é:

Tabela 4

Hormônios selecionados

Analito	Unidades SI	Fator de conversão (SI para unidades convencionais)	Unidades convencionais
Hormônio estimulante da tireoide (TSH)	0,4-4,0 mU/L		
T4 livre	9-25 pmol/L	0,08	0,7-2,0 ng/dL
T3 livre	3,5-6,5 pmol/L	65	228-422 pg/dL
Cortisol (plasma):			
às 8 horas	240-600 nmol/L	0,036	8,6-21,6 µg/dL
às 24 horas	<50 nmol/L		<1,8 µg/dL
Cortisol livre urinário	<250 nmol/24 h		<9 µg/dL
Hormônio folículo-estimulante (FSH):			
fase folicular	3-13 U/L	1,0	3-13 mUI/mL
fase ovulatória	9-18 U/L		9-18 mUI/mL
fase lútea	1-10 U/L		1-10 mUI/mL
pós-menopausa	18-150 U/L		18-150 mUI/mL
Hormônio luteinizante:			
fase folicular	2-15 U/L	1,0	2-15 mUI/mL
fase ovulatória	22-90 U/L		22-90 mUI/mL
fase lútea	1-19 U/L		1-19 mUI/mL
Pós-menopausa	16-64 U/L		16-64 mUI/mL
Progesterona (fase lútea média)	<20 nmol/L	0,33	6,4 ng/mL
Hormônio da paratireoide	1,1-6,9 pmol/L	9,16	11-69 pg/mL

Tabela 5

Colesterol e outros lipídios

Analito/interpretação do teste	Unidades SI	Fator de conversão (SI para unidades convencionais)	Unidades convencionais
Colesterol total			
Desejável	<5,18 mmol/L	38,6	<200 mg/dL
Limítrofe-elevado	5,18-6,18		200-239 mg/dL
Elevado	>6,21		>240 mg/dL
Colesterol LDL		38,6	
Ótimo	<2,6 mmol/L		<100 mg/dL
Quase ótimo	2,6-3,3		100-129 mg/dL
Limítrofe-elevado	3,4-4,1		130-159 mg/dL
Elevado	4,2-4,9		160-189 mg/dL
Muito elevado	>5,0		≥190 mg/dL
Colesterol HDL			
Elevado	<1,0 mmol/L	38,6	<40 mg/dL
Baixo	>1,6 mmol/L		>60 mg/dL
Triglicerídios (desejável)	<1,7 mmol/L	88,4	<150 mg/dL

A interpretação dos níveis de lipídios baseia-se nos limites de decisão clínica desenvolvidos pela ATP3, e não em intervalos de referência

ATP3: Programa Nacional de Educação para o Colesterol (EUA) – Painel de Tratamento de Adultos 3

Para mais detalhes acerca dos valores dos lipídios e objetivos do tratamento, ver: www.nhlbi.nih.gov/guidelines/cholesterol/atp3xsum.pdf (recomendações dos Estados Unidos) e www.bcs.com/download/651/JBS2final.pdf (Recomendações britânicas)

Vale lembrar que podem ter sido lançados critérios atualizados (ATP4) enquanto este livro estava sendo impresso.

Tabela 6

Analito/interpretação do teste	Unidades SI	Fator de conversão (SI para unidades convencionais)	Unidades convencionais
Glicose: concentrações normais e estados de intolerância à glicose			
Intervalo normal (plasma)	4-6 mmol/L	18	72-109 mg/dL
Glicose em jejum	<6,1		<110
Anomalia da glicemia em jejum (AGJ)	≥6,1 mas <7,0 mmol/L		≥110 mas <126 mg/dL
Anomalia da tolerância à glicose (ATG)			
Em jejum	<6,1 mmol/L		<110 mg/dL
2 horas após ingestão de glicose	≥7,8 <11,1		≥140 mas <200
Pré-diabetes (categoria ADA)			
Em jejum	≥5,6 <7,0 mmol/L		≥101 mas <126 mg/dL

PTGO 2 horas após ingestão	≥7,8 <11,11		≥140 mas <200
Glicose: Diabetes melito			
Em jejum	≥7,0 mmol/L		≥126 mg/dL
PTGO 2 horas após ingestão de glicose	>11,1		>200
Evidência de diabetes na gravidez			
Em jejum	≥7,0 mmol/L		≥126 mg/dL
PTGO 2 horas após ingestão de glicose	≥11,1		≥200
Diabetes gestacional			
Em jejum	≥5,1 mmol/L		≥92 mg/dL
PTGO 1 hora após ingestão de glicose	≥10,1		≥182
PTGO 2h após ingestão de glicose	≥8,5		≥153
Hemoglobina glicosilada			
Intervalo normal	20-38 mmol/mol	*	4,0%-5,6%
Pré-diabetes (categoria ADA)	≥39 mas <43		≥5,7 mas <6,1
Diabetes melito	≥48		≥6,5
Evidência de diabetes na gravidez	≥48		≥6,5

Os critérios para o diagnóstico do diabetes melito e da intolerância à glicose foram desenvolvidos por diversos organismos nacionais e internacionais. Aqui, citamos os mais aceitos, desenvolvidos pela American Diabetes Association(ADA), a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups - IADPSG (IADPSG).

É importante observar o seguinte:

1. *Os critérios da ADA e da OMS para o diagnóstico de diabetes em mulheres que não estão não grávidas são os mesmos. Eles se diferem ligeiramente, no entanto, no caso de definições de intolerância à glicose. A ADA usa o termo "pré-diabetes", enquanto a OMS distingue as condições AGJ e ATG.*
2. *Os critérios para o diagnóstico da diabetes evidente à gravidez encontram-se estabelecidos abaixo daqueles de mulheres que não estão grávidas.*
3. *A interpretação da PTGO na gravidez envolve a concentração da glicose em jejum e os valores tanto após 1 hora quanto 2 horas da ingestão de glicose, enquanto em mulheres que não estão grávidas a interpretação baseia-se apenas no jejum e em valores 2 horas após a ingestão.*

Para mais detalhes, ver Nolan et al nas Leituras Sugeridas.

HbA1c (mmol/mol) = [HbA1c(%) −2,15] × 10,929 http://www.diabetes.org.uk/Professionals/Publications-reports-and-resources/Changes-to-HbA1c-values/

*Fórmula para converter os valores convencionais (DCCT) da HbA1c para unidades IFCC (SI):

Tabela 7

Testes diversos

Analito	Unidades SI	Fator de conversão (SI para unidades convencionais)	Unidades convencionais
Amilase	*		0-100 U/L
Urato:			
homens	0,2-0,5 mmol/L	16,8	5,0-8,0 mg/dL
mulheres	0,1-0,4 mmol/L		2,5-6,2 mg/dL
Lactato	0,7-1,8 mmol/L	9,0	6-16 mg/dL

Tabela 8

Análise de urina

Analito	Unidades SI	Fator de conversão (SI para unidades convencionais)	Unidades convencionais
Microalbumina na urina	<20 mg/L homens		
Razão albumina/creatinina (RAC):			
Homens	*		<2,5 mg/mmol creatinina
Mulheres	*		<3,5 mg/mmol creatinina
Taxa de excreção da microalbumina (TEA)	*		<20 µg/min
Osmolalidade	50-1.200 mmol/kg	1,0	50-1.200 mOsm/kg

Tabela 9

Testes hematológicos

Analito/teste	Unidades SI	Unidades convencionais
Hemoglobina:		
homens	130-180 g/L	13,0-18,0 g/dL
mulheres	120-160 g/L	12,0-16,0 g/dL
Hematócrito	41-46%	41-46 mL/dL
Contagem de eritrócitos:		
homens	4,4-5,9 × 10^{12}/L	4,4-5,9 × 10^{6}/mm^3
mulheres	3,8-5,2 × 10^{12}/L	3,8-5,2 × 10^{6}/mm^3
Volume corpuscular médio (VCM)	80-96 fL	80-96 μm^3
Leucócitos, total	4,0-11,0 × 10^{9}/L	4.000-11.000/mm^3
Leucócitos, contagem diferencial:		
neutrófilos	2-7,5 × 10^{9}/L	45%-74%
linfócitos	1,3-4 × 10^{9}/L	16%-45%
monócitos	0,2-0,8 × 10^{9}/L	4%-10%
eosinófilos	0,04-0,4 × 10^{9}/L	0,0%-7%
basófilos	0,01-0,1 × 10^{9}/L	0,0%-2%
Plaquetas	150-400 × 10^{9}/L	150.000-400.000/mm^3
Reticulócitos	25-75 × 10^{9}/L	0,5%-1,5% dos eritrócitos
Taxa de sedimentação de eritrócitos (TSE)	2-10 mm/h	
Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA)	30-40 seg	
Tempo de protrombina (TP)	10-15 seg	
Tempo de coagulação da trombina (TCT)	10-15 seg	
Tempo de sangramento na pele	2-9 min	
Dímero D	<0,25 g/L	

Tabela 10

Testes relacionados com o metabolismo do ferro e a investigação da anemia

Analito	Unidades SI	Fator de conversão (SI para unidades convencionais)	Unidades convencionais
Ferritina (soro)	31-450 pmol/L	0,445	14-200 ng/mL
Vitamina B_{12} (soro)	138-780 pmol/L	1,36	187-1.060 pg/mL
Folato (soro)	12-33 nmol/L	0,442	5,3-14,6 ng/mL

Leituras sugeridas

Bakerman, S. *Bakerman's ABC of interpretive laboratory data*, ed 4. Scottsdale: AZ; 2002.

Burtis, C. A., Ashwood, E. R., Bruns, D. E. *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*, ed 5. Philadelphia: Saunders; 2011.

Dominiczak M.H., ed. Seminars in clinical biochemistry. Glasgow: University of Glasgow, 1997.

Stone NJ, Robinson J, Lichtenstein AH, et al. ACC/AHA Prevention Guideline: 2013 ACC/AHA Guideline on the Treatment of Blood Cholesterol to Reduce Atherosclerotic Cardiovascular Risk in Adults: A Report of the American College of Cardiology/ American Heart Association Task Force on Practice Guidelines, *Circulation* 01: 2013. *Published online before print November 12 2013*. http://circ.ahajournals.org/content/early/2013/11/11/01.cir.0000437738.63853.7a.citation.

Sites

American Diabetes Association: Standards of Medical Care in Diabetes - 2012, http://care.diabetesjournals.org/content/35/Supplement_1/S11.full.

Diabetes: update on ADA guidelines 2012, www.aca.org/conferences/winter2012/WorkshopPresentations/A-1D%20Diabetes%20An%20Update%20on%20American%20Diabetes%20Association%20Guidelines.pdf.

Lab Tests Online: www.labtestsonline.org.uk/

Lab Tests Online: www.labtestsonline.org.uk/understanding/features/ref-ranges/

National Cholesterol Education Program ATP III Guidelines At-A-Glance Quick Desk Reference, www.nhlbi.nih.gov/guidelines/cholesterol/atglance.pdf.

Nolan, C. J., Damm, P., Prentki, M. Type 2 diabetes across generations: from pathophysioplogy to prevention and treatment. *Lancet*. 2011; 378:169–181.

SI values conversion calculator, www.amamanualofstyle.com/oso/public/jama/si_ conversion_table.html.

APÊNDICE 2

Os Fundamentos da Tecnologia do DNA Recombinante: Hibridização Molecular e Clonagem de DNA

W. Stephen Kistler

Introdução

Nossa atual capacidade de análise e manipulação de genomas iniciou-se a partir de relatos na década de 1970 de métodos para clivagem de DNA em sítios específicos, inserção de novos fragmentos de DNA em plasmídios bacterianos e sequenciamento de regiões de DNA contendo mais do que alguns nucleotídios. Antes deste desenvolvimento, os genes em humanos eram conhecidos quase exclusivamente por seus efeitos, ou seja, fenótipos e doenças — os genes eram conceitos, e não estruturas. Aos poucos, tornou-se possível ver exatamente o que era um gene e determinar se os genes eram normais ou mutados. Um grande passo neste processo foi o reconhecimento de que as cadeias simples de ácidos nucleicos formarão pares de cadeia dupla (ds) entre elas apenas se as sequências forem altamente similares ou idênticas. Tal como os anticorpos conseguem detectar proteínas únicas entre milhares de outras, as sequências de ácidos nucleicos unir-se-ão apenas com seu complemento na presença de milhões de sequências incompatíveis. Um segundo avanço importante foi a descoberta de enzimas de restrição, que convertem DNA cromossômico em fragmentos discretos de comprimento útil. Após a separação por tamanho, esses fragmentos menores puderam ser detectados por sondas de ácidos nucleicos e também sequenciados. Ainda que muitos dos procedimentos usados para a análise de DNA no século XX sejam em grande parte de interesse histórico nos dias de hoje, é necessário algum conhecimento deles tanto para a leitura da literatura mais antiga quanto para a compreensão da tecnologia do DNA recombinante moderna. A capacidade de fazer *splicing* e de recombinar fragmentos de DNA em vírus, plasmídios bacterianos e mesmo cromossomos revolucionou a produção de muitas proteínas humanas clinicamente importantes, bem como de vacinas.

Este Apêndice oferece uma visão global de algumas das técnicas gerais para a formação do chamado DNA recombinante e para a clonagem desse DNA.

Os princípios da hibridização molecular

A hibridização baseia-se nas propriedades de *annealing* do DNA

A hibridização é um processo por meio do qual uma porção de DNA ou RNA de sequência nucleotídica conhecida, cujo tamanho pode variar entre valores tão baixos como 15 pares de bases (bp) e várias centenas de quilobases, é utilizada para identificar uma região ou fragmento de DNA contendo sequências complementares. A primeira porção de DNA ou RNA é chamada de sonda. O DNA da sonda vai parear por complementaridade de bases com outra cadeia de DNA, muitas vezes denominada alvo, caso as duas cadeias sejam complementares e se formar um número suficiente de pontes de hidrogênio.

Na hibridização molecular, é essencial que a sonda e o alvo sejam inicialmente de cadeia simples

As sondas podem variar tanto em tamanho quanto em natureza (DNA, RNA ou oligonucleotídicas). No entanto, uma característica essencial de qualquer reação de hibridização é a de que a sonda e o alvo devem estar livres para formar pares de bases entre eles. Para a hibridização de DNA, as duas cadeias de DNA devem ser primeiramente separadas por meio de um tratamento térmico ou químico, em um processo denominado **desnaturação** ou ***melting*** de DNA. Quando o DNA da sonda e do alvo são de cadeia simples, a combinação dos dois sob condições que favoreçam a formação de uma hélice com duas cadeias possibilitará a recombinação de bases complementares. Este processo é denominado ***annealing*** ou **reassociação** de DNA e, quando a cadeia de uma sonda reage com uma cadeia-alvo, o complexo é denominado **heteroduplex**.

A formação de heteroduplexes sonda-alvo é fundamental para a hibridização molecular

As condições sob as quais a hibridização de DNA ocorre e a fiabilidade e a especificidade, ou estringência, da hibridização são afetadas por vários fatores:

- **composição das bases:** pares GC têm três pontes de hidrogênio, comparadas com as duas dos pares AT. O DNA de cadeia dupla com um elevado conteúdo GC é, por isso, mais estável e tem uma maior temperatura de *melting* (T_m).
- **comprimento da cadeia:** quanto mais longa é uma cadeia de DNA, maior é o número de pontes de hidrogênio entre as duas cadeias. Cadeias mais longas requerem temperaturas mais altas ou tratamento alcalino mais forte para desnaturá-las; a estabilidade varia bastante em função do comprimento para sondas muito curtas, mas, acima de algumas centenas de pares de bases, a estabilidade é relativamente insensível ao comprimento e é determinada principalmente pela composição das bases.
- **condições de reação:** elevadas concentrações de cátions (tipicamente Na^+) favorecem o DNA de dupla cadeia (porque as cargas negativas no esqueleto açúcar-fosfato ficam protegidas umas das outras), enquanto altas concentrações de ureia ou formamida favorecem o DNA de cadeia simples (porque estes reagentes reduzem o empacotamento de bases e podem competir pela formação de pontes de hidrogênio). Considera-se que as hibridizações são levadas a cabo com **baixa estringência** quando

as condições favorecem fortemente a formação de duplexes, possibilitando algum pareamento errôneo no duplex de DNA, e com **alta estringência** quando se formam apenas duplexes pareados, complementares.

Assim, por seleção apropriada das condições (alta estringência), uma sonda pequena de 30-50 bp pode requerer um pareamento perfeito para formar um híbrido estável com seu alvo. Por outro lado, sob baixa estringência, uma sonda mais longa, por exemplo de 500 bp, poderá reagir com alvos que contêm múltiplos pareamentos errôneos ou mutações (Fig. A2.1).

A Características de hibridização usando uma sonda convencional grande (>200 bases)

Pareamento	**Perfeito**	**Pareamento errado de uma única base**	**Pareamento errado múltiplo**
Estringência	Elevada	Intermédia	Baixa
Exemplo	Alvo humano + sonda humana	Alvo humano + sonda humana com mutação	Alvo humano + sonda de camundongo
Estabilidade	Estável	Estável	Estável

B Características de hibridização usando uma sonda oligonucleotídica pequena

Pareamento	**Perfeito**	**Pareamento errado de uma única base**	
Estringência	Elevada	Elevada	
Exemplo			
Estabilidade	Estável	Instável	

FIG. A2.1 Hibridização sonda-molde. **(A)** Sondas grandes, como as de 200 ou mais bases, podem formar heteroduplexes estáveis com o DNA-alvo, mesmo quando existe um número significativo de bases não complementares, em condições de baixa estringência. **(B)** As sondas oligonucleotídicas, pelo contrário, podem discriminar entre alvos que se diferem em uma única base sob condições estringentes.

A estabilidade de um duplex de ácidos nucleicos pode ser avaliada determinando sua temperatura de *melting* (T_m)

A temperatura de melting (T_m) é a temperatura, *in vitro,* à qual 50% de um duplex de dupla cadeia se dissociou em cadeia simples. Para sondas de DNA relativamente longas, a T_m é determinada principalmente pela composição das bases, com o DNA rico em AT sofrendo *melting* a uma temperatura mais baixa do que o DNA rico em GC. Para os humanos e os outros mamíferos, o conteúdo em GC é de cerca de 40% e a temperatura de *melting* em concentração salina moderada é de aproximadamente 87°C. Para

oligonucleotídios curtos, como os *primers* utilizados nas reações em cadeia da polimerase (PCR), os efeitos de comprimento, de composição e até as várias sequências dinucleotídicas devem ser levadas em consideração. Isso se deve ao fato de o DNA de dupla cadeia ficar estabilizado, pelo grau de superposição pelas bases empacotadas em nucleotídios sucessivos, e varia dependendo dos nucleotídios específicos vizinhos de uma base em particular. Existem programas informáticos amplamente disponíveis para prever os valores de T_m.

As sondas devem ter uma marcação para serem identificadas

Implícita ao uso de sondas para identificar porções de DNA complementares é a noção de que, se a hibridização ocorre, o heteroduplex pode ser detectado especificamente. Assim, a sonda é marcada para que o duplex sonda-alvo possa ser identificado. Geralmente, as marcações podem pertencer a duas categorias, isotrópicas, como aquelas envolvendo átomos radioativos, ou não isotrópicas, como as sondas marcadoras de extremidades com caudas fluorescentes ou pequenas moléculas ligantes. Muitas técnicas envolvendo a hibridização e a marcação da sonda ainda usam radioisótopos como o ^{32}P, o ^{35}S ou o ^{3}H e, como tal, requerem um método de detecção e localização da radioatividade. O método mais comum envolve o processo de **autorradiografia**. A autorradiografia possibilita que a informação de uma fase sólida, por exemplo um gel ou uma amostra de tecido fixada, seja detectada e guardada de modo bidimensional como uma imagem fotográfica exposta.

Os *Southern blots* são o protótipo para métodos que usam sondas de hibridização específicas para identificar sequências em DNA e RNA

Um dos passos fundamentais na evolução da biologia molecular foi a descoberta de que o DNA podia ser transferido de um gel semissólido para uma membrana de nitrocelulose, de tal modo que a membrana pudesse agir como um registro da informação do DNA no gel e ser usada para experimentos com várias sondas. O processo pelo qual o DNA é transferido para a membrana foi inicialmente descrito por Edwin Southern, mas técnicas subsequentes com base na transferência de RNA e proteínas também adotaram o tema da direção e são denominadas Northern (RNA-alvo) e Western blots (proteína-alvo), respectivamente.

Enzimas de restrição

Utilização de enzimas de restrição para analisar DNA genômico

As enzimas de restrição clivam DNA em sequências nucleotídicas específicas

As endonucleases de restrição clivam DNA de dupla cadeia. Essas enzimas são específicas para sequências e cada enzima atua em um número limitado de sítios no DNA, denominados sítios de "reconhecimento" ou "corte". As endonucleases de

restrição fazem parte do "sistema imunitário" bacteriano. As bactérias metilam seu próprio DNA, protegendo-o de suas próprias enzimas de restrição, mas clivam DNA infecciosos virais ou de bacteriófagos desmetilados em sítios específicos, inativando os vírus e restringindo a infecção viral.

Se o DNA for digerido por uma enzima de restrição, ele será reduzido a fragmentos de tamanhos variados, dependendo de quantos sítios de corte para essa enzima de restrição estão presentes no DNA. Muitas vezes, os sítios de corte são **sequências palindrômicas**, sítios nos quais a sequência de bases é lida do mesmo modo, de trás para a frente e da frente para trás. Vale lembrar que cada enzima cortará o DNA em um conjunto único de segmentos (Fig. A2.2). Muitas enzimas de restrição reconhecem sítios que têm tipicamente quatro (p. ex., HaeIII), seis (p. ex., EcoR I) ou oito nucleotídios (p. ex., NotI) de comprimento (Tabela A2.1). A variação em apenas um nucleotídio dentro da sequência de reconhecimento torna a sequência completamente resistente a uma enzima em particular.

Tabela A2.1

Endonucleases de restrição de uso comum

Endonuclease	Sítio de restrição	Extremidades
HaeIII	GG*CC CC*GG	Abruptas
MspI	C*CGG GGC*C	Coesivas
EcoRV	GAT*ATC CTA*TAG	Abruptas
EcoRI	G*AATTC CTTAA*G	Coesivas
NotI	GC*GGCCGC CG CCGG*CG	Coesivas

As enzimas podem clivar o DNA produzindo "extremidades abruptas", em que o DNA é cortado "verticalmente", deixando duas extremidades que não têm quaisquer nucleotídios em projeção. Contudo, se o DNA for clivado "obliquamente", ele terá pequenas projeções de cadeia simples. Tais extremidades são denominadas "coesivas", pois elas se reúnem (hibridizam) seletivamente com as projeções complementares. Os sítios de clivagem do DNA pelas enzimas de restrição são frequentemente descritos como palindrômicos, devido à sua simetria repetida invertida — eles têm sequências idênticas em direções opostas nas cadeias complementares.

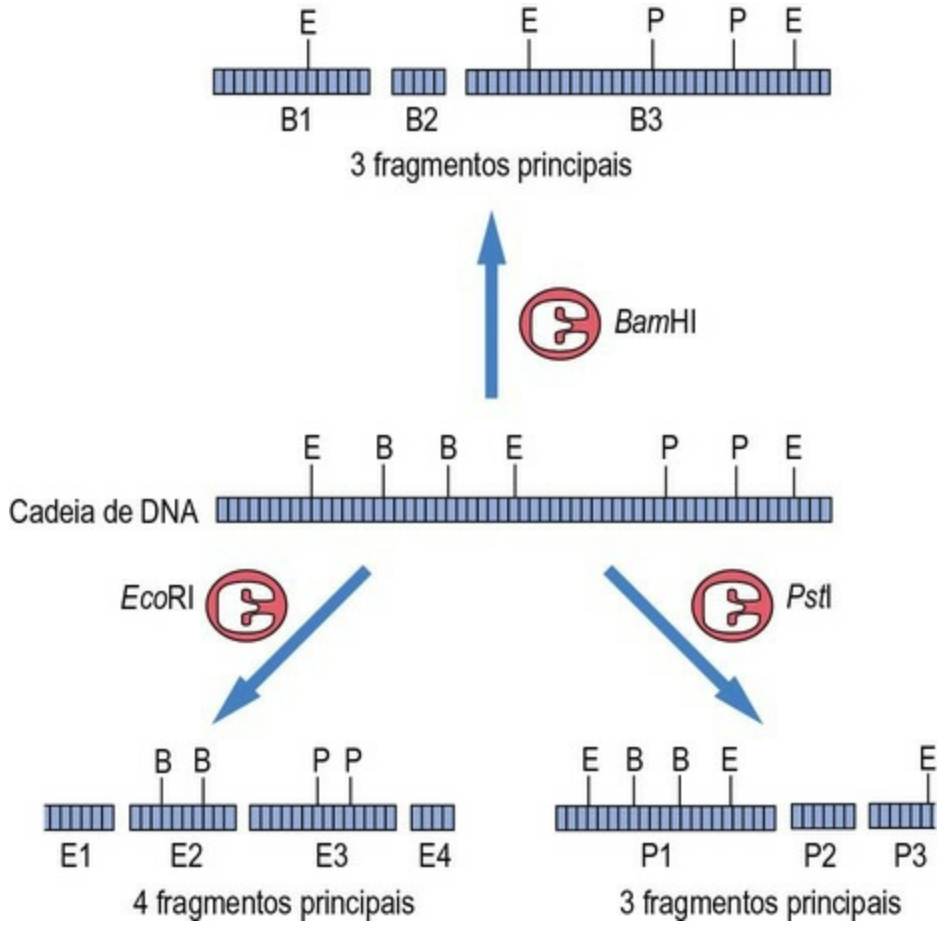


FIG. A2.2 Digestão do DNA por restrição enzimática. A digestão de uma molécula de DNA por várias enzimas de restrição diferentes pode resultar em muitos fragmentos diferentes, embora o tamanho aparente dos fragmentos seja similar. Por exemplo, os fragmentos E1 e P3 têm tamanho similar, mas são porções claramente diferentes de DNA. E, sítio *Eco*RI; B, local *Bam*HI; P, local *Pst*I.

A frequência dos sítios de corte para diversas enzimas varia com o comprimento do sítio de reconhecimento. Sítios de corte para uma enzima com sítios de reconhecimento de quatro bases de comprimento, como a HaeIII, ocorreriam provavelmente uma vez em cada sequência com 256 pares de bases. Os sítios de corte para uma enzima com sítios de reconhecimento de oito bases, como a NotI, ocorreriam apenas uma vez em cerca de 656.000 pares de bases. Assim, enzimas que cortam, com frequência, costuma produzir muitos fragmentos pequenos, enquanto as que cortam mais raramente geram menos fragmentos, mas de maiores dimensões. Estas diferenças podem ser exploradas na análise da estrutura de genes e localização de cromossomos.

Fragmentos de DNA, imobilizados em uma fase de gel sólido, são usados como molde para exposição a um conjunto de sondas moleculares

Se o DNA é digerido por uma enzima de restrição, o produto de digestão resultante pode ser separado com base no tamanho por meio da eletroforese em gel. A eletroforese em gel de agarose é comumente utilizada para separar fragmentos com tamanhos desde 100 bases a aproximadamente 20 kb (acima de 40 kb, a resolução é mínima). Depois da eletroforese, os géis são imersos em uma solução alcalina forte para desnaturar o DNA. Estes fragmentos de cadeia simples podem depois ser transferidos para uma membrana de nitrocelulose ou de nylon à qual eles se ligam prontamente e, se preservados de forma correta, permanentemente. O processo de transferência envolve a passagem de soluto

através do gel, transportando passivamente o DNA e produzindo uma imagem do gel na membrana (Fig. A2.3). A membrana pode depois ser sondada com um oligonucleotídio ou um fragmento de DNA *(Southern blot)*, como para genotipagem, testes de paternidade ou identificação de células que incorporam um gene durante um experimento de clonagem (a seguir).

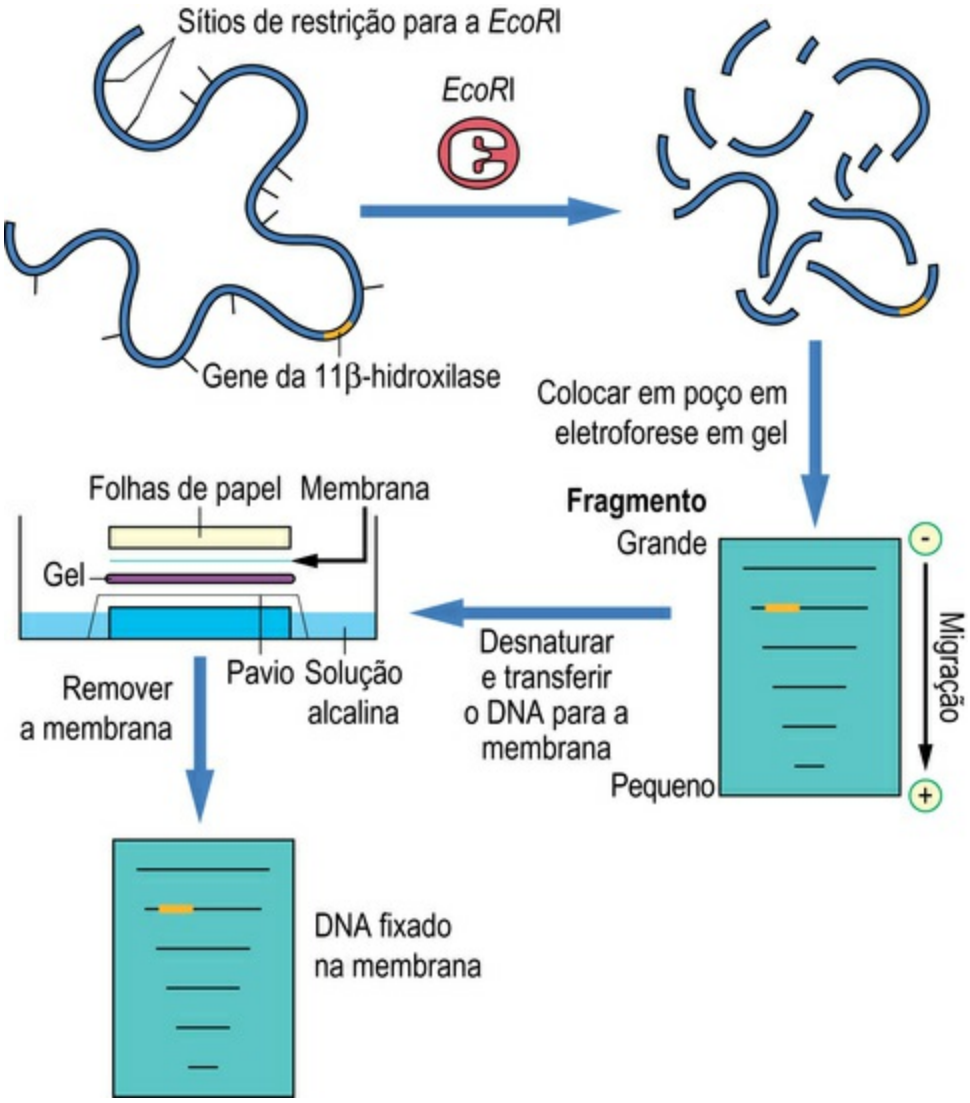


FIG. A2.3 *Southern blotting* de DNA. O DNA digerido com uma enzima de restrição é fracionado por tamanho por eletroforese em agarose. O gel de agarose é colocado em uma solução alcalina para desnaturar o DNA. O agora DNA em cadeia simples pode passar do gel para a membrana (tipicamente de *nylon* ou nitrocelulose), à medida que a solução-tampão flui em sentido ascendente por ação capilar, formando um registro permanente do DNA digerido.

Polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLPs)

A análise do tamanho dos fragmentos de restrição pode ser usada para detectar uma mutação ou um polimorfismo em um gene

Se uma mudança na sequência do DNA cria ou destrói um sítio de reconhecimento que

origina um fragmento detectado por uma sonda, a alteração do comprimento desse fragmento pode ser detectada por *Southern blotting*. Se o sítio de clivagem é criado, o fragmento fica menor; caso o sítio de clivagem seja eliminado, o fragmento torna-se maior. Os diferentes padrões gerados como resultado da mutação ou variante gênica são conhecidos como polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) (Fig. A2.4). Esses RFLP podem ser usados tanto para identificar mutações causadoras de doenças, por causa de uma mutação pontual criando ou abolindo um sítio de restrição, quanto para estudar a variação em DNA não codificante para utilização no estudo de *linkage* genético.

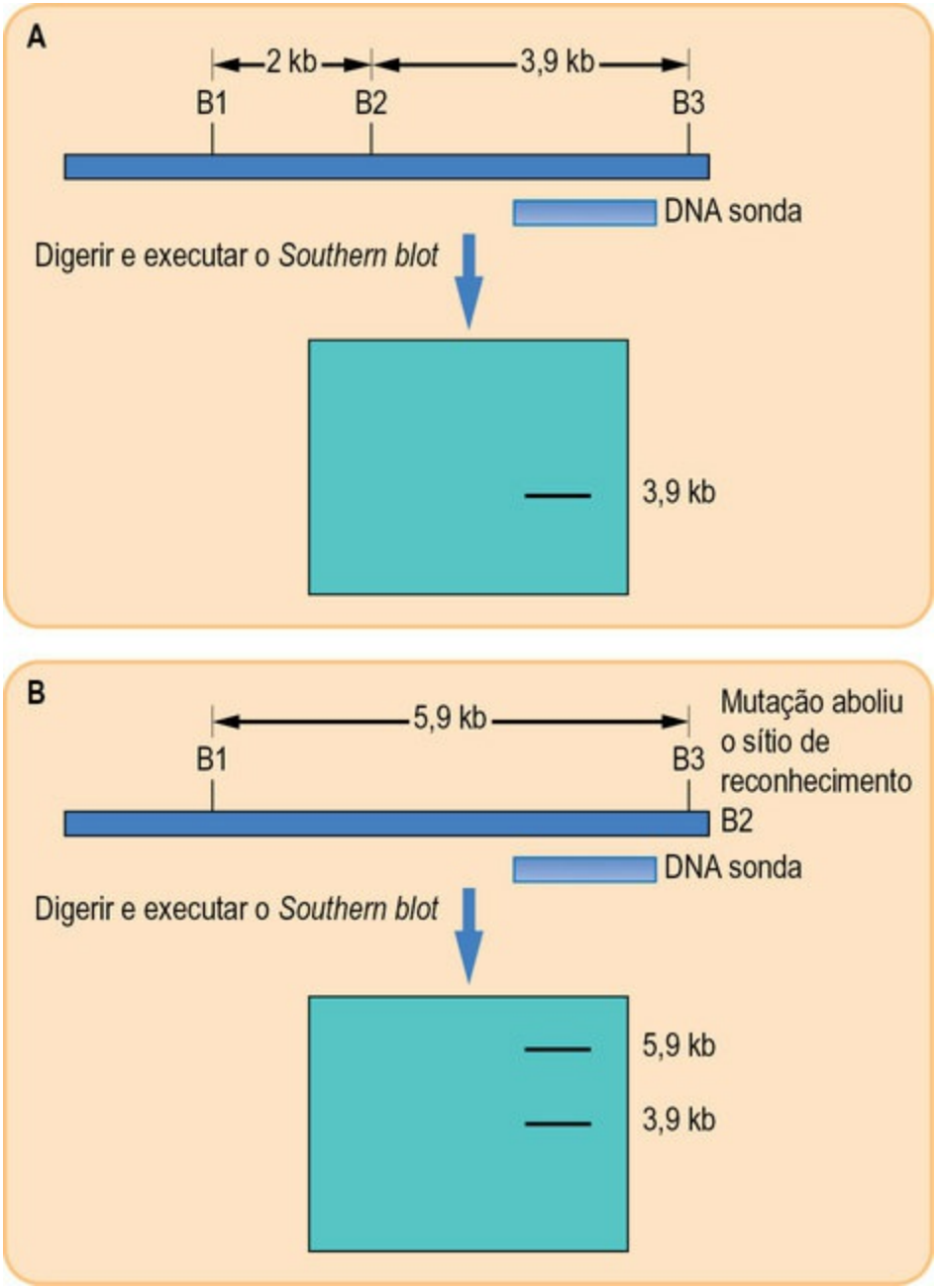


FIG. A2.4 Polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP). Variações na sequência nucleotídica do DNA, devido à variação natural em indivíduos ou como resultado de uma mutação no DNA, podem abolir os sítios de reconhecimento de enzimas de restrição. Isso significa que, quando o DNA é digerido com a enzima cujo sítio foi abolido, o tamanho dos fragmentos resultantes é alterado. O *Southern blotting* e a hibridização de sondas podem ser utilizados para detectar essa alteração. São apresentados os resultados para um gene representativo de indivíduos **(A)** homozigotos normais e **(B)** heterozigotos mutantes. B, sítio de restrição da *Bam*HI.

A análise por RFLP pode também detectar alterações patológicas maiores na sequência de DNA, tanto deleções quanto duplicações. Grandes deleções de um gene podem abolir sítios de restrição; isto leva ao desaparecimento de um fragmento no *Southern blot* em indivíduos homozigotos. Por outro lado, se um evento de duplicação de DNA ocorrer, um novo gene pode ser formado, com um padrão diferente de sítios de restrição que possibilitam a detecção do novo gene. Este tipo de hibridização é realizado utilizando sondas grandes (0,5-5,0 kb) sob estringência moderada, ou seja, é suficientemente rígido para tornar possível a hibridização da sonda e do alvo, mas também para tolerar diferenças mínimas, como em um DNA não codificante.

A hibridização de baixa estringência de uma sonda com um *Southern blot* de DNA

digerido possibilita que genes relacionados, mas não idênticos ao gene de partida, sejam identificados. Muitos genes existem em famílias, ou têm cópias não funcionais, praticamente idênticas em outros sítios do genoma (pseudogenes), e por isso a hibridização de uma sonda pode identificar um ou mais fragmentos de restrição, correspondendo a genes relacionados. Do mesmo modo, genes relacionados em espécies diferentes podem ser identificados usando uma única sonda que possa hibridizar a uma baixa estringência com sequências complementares em *blots* de DNA de camundongo, rato ou outra espécie.

Clonagem de DNA

Clonagem com base em células

Os plasmídios bacterianos são desenhados por bioengenharia de modo a otimizar seu uso como vetores

A clonagem com base em células depende da capacidade de células replicativas, como as bactérias, possibilitarem a replicação do chamado DNA recombinante nelas mesmas. O DNA recombinante refere-se a qualquer molécula de DNA que foi artificialmente construída a partir de duas porções de DNA que normalmente não se encontram juntas. Uma porção de DNA será o DNA-alvo a ser amplificado e a outra será o **vetor** replicativo ou de replicação, uma molécula capaz de iniciar a replicação do DNA em uma célula hospedeira adequada.

Atualmente, a maioria das clonagens com base em células é realizada usando células bacterianas. Além do cromossomo bacteriano, as bactérias poderão conter DNA extracromossômico em cadeia dupla, que pode sofrer replicação. Um exemplo disso é o plasmídio bacteriano. Os **plasmídios** são moléculas de DNA circular, em cadeia dupla, que sofrem replicação intracelular e são passados verticalmente da célula parental para cada célula-filha. No entanto, ao contrário do cromossomo bacteriano, os plasmídios usados nessas técnicas são copiados muitas vezes durante cada divisão celular. Assim, os plasmídios são portadores ideais para a amplificação de DNA-alvo e, desse modo, da proteína codificada. Os métodos envolvendo o uso de plasmídios encontram-se generalizados a toda a biologia molecular.



Quadro clínico

Utilização de rflp para a detecção do gene da anemia falciforme

Uma mulher afro-caribenha de 24 anos foi encaminhada para o exame pré-natal. Seu irmão mais novo tinha anemia falciforme e ela se encontrava grávida. Sabia-se que seu companheiro era portador da mutação da anemia falciforme (traço falciforme) e ela pretendia saber se seu filho desenvolveria anemia falciforme.

Uma vez que a paciente está em risco de ser portadora, ela optou por fazer uma

biopsia das vilosidades coriônicas (BVC) para detectar a presença ou a ausência da mutação falciforme em sua criança. A análise de seu próprio DNA revelou que ela era portadora, e a BVC demonstrou que a criança era igualmente portadora e que não desenvolveria anemia falciforme.

Comentário

Ocasionalmente, uma mutação abolirá ou criará diretamente um sítio de restrição, o que possibilita o uso de um método com base em uma restrição para demonstrar a presença ou a ausência do alelo mutante. Uma mutação bastante analisada é a substituição A > T no códon 6 na sequência do gene da β-globina, responsável pela anemia falciforme (Cap. 5). Isso resulta em uma substituição glutamina-valina (Glu-Val) na sequência de aminoácidos da β-globina e também elimina um sítio de restrição para a *Mst*II (CCTN[A > T]GG) no gene da β-globina. A digestão do DNA humano normal com a *Mst*II e a utilização de uma sonda específica para o promotor do gene da β-globina em *Southern blot* origina uma única banda de 1,2 kb, já que o sítio *Mst*II mais próximo localiza-se 1,2 kb a montante, na região 5′ do gene. A eliminação do sítio de restrição do códon 6 significa que o tamanho do fragmento observado quando da utilização da sonda com DNA digerido com *Mst*II é agora de 1,4 kb, uma vez que o sítio *Mst*II seguinte localiza-se 200 bases a jusante, no íntron após o éxon 1. Assim, os pacientes com anemia falciforme exibirão apenas uma banda, de 1,4 kb, enquanto os portadores terão duas bandas, uma de 1,4 kb e outra de 1,2 kb, e os indivíduos não afetados terão uma única banda de 1,2 kb.

O DNA-alvo é introduzido em um plasmídio, usando enzimas de restrição para cortar o DNA-alvo e aquele do plasmídio, de modo que o DNA-alvo e o DNA linearizado do vetor tenham extremidades coesivas complementares (Fig. A2.5). Então, a DNA ligase une covalentemente o alvo às extremidades do vetor para formar um plasmídio recombinante circular fechado. Após o DNA-alvo estar incorporado no vetor plasmídico, o passo seguinte é a introdução do plasmídio em uma célula hospedeira a fim de possibilitar a ocorrência de replicação. A membrana plasmática das bactérias é seletivamente permeável e evita a passagem livre de moléculas grandes, como as de DNA, para dentro e fora da célula. No entanto, a permeabilidade celular pode ser temporariamente alterada por fatores como correntes elétricas (eletroporação) ou concentrações elevadas de solutos (estresse osmótico), de modo que a membrana se torne temporariamente permeável e o DNA possa entrar na célula. Tal processo torna as células competentes, ou seja, elas podem captar DNA exógeno a partir do fluido extracelular, em um processo conhecido como **transformação**. Esse processo é geralmente ineficiente, de tal maneira que apenas uma pequena fração de células internaliza o DNA plasmídico, e é frequentemente introduzido apenas um único plasmídio por bactéria durante a transformação. Contudo, é este processo de captação celular de DNA plasmídico que constitui um passo fundamental na clonagem com base em células. Os DNAs recombinantes individuais são de fácil resolução, conforme são captados por células separadas, que podem ser isoladas simplesmente por espalhamento

em uma superfície de ágar.

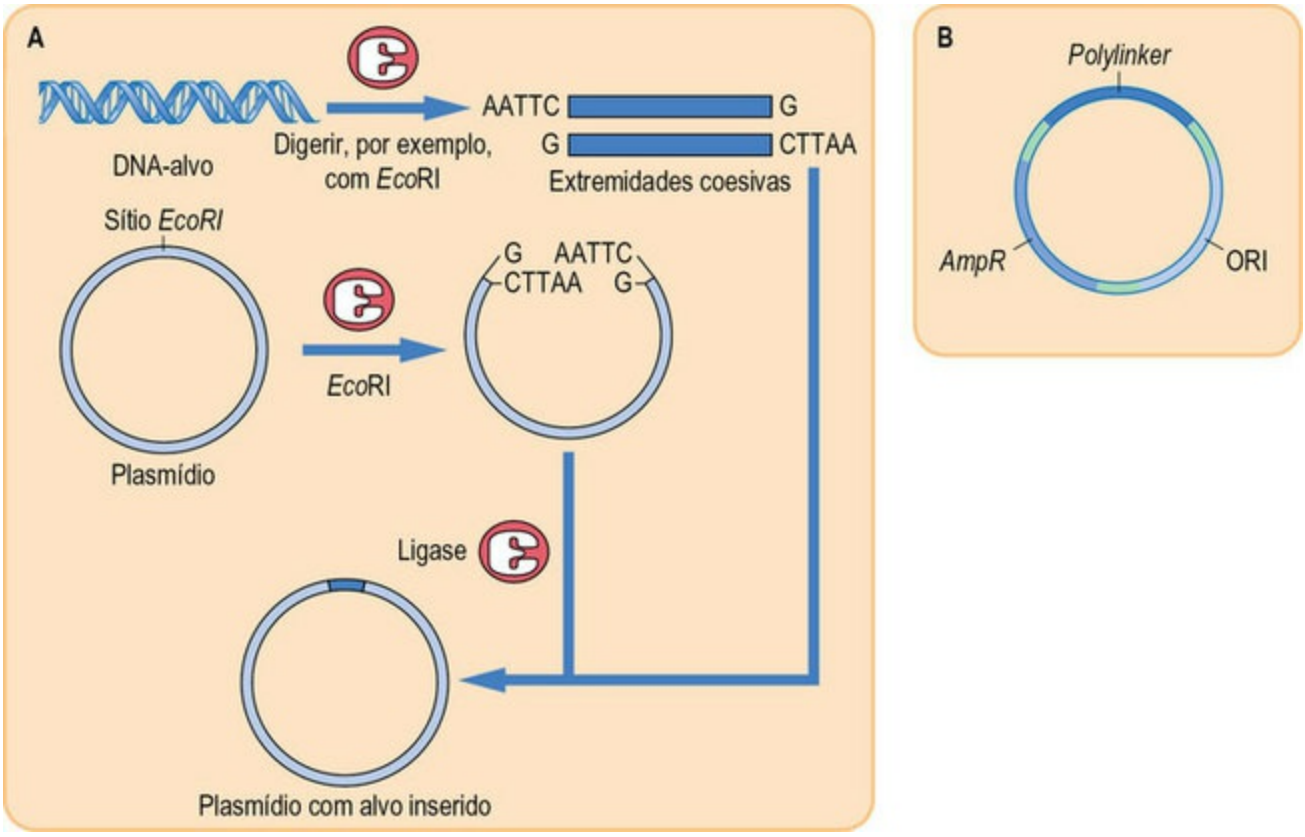


FIG. A2.5 Formação de um plasmídio contendo um gene-alvo para clonagem. **(A)** O DNA contendo o gene-alvo é digerido com uma enzima de restrição que produzirá "extremidades coesivas", como a *Eco*RI. O plasmídio também contém um sítio de restrição para a *Eco*RI, de modo que, quando digerido com a *Eco*RI, se torna uma cadeia de DNA linear com "extremidades coesivas" complementares ao alvo. Após a ligação, o alvo e o vetor formam uma molécula recombinante. **(B)** Estrutura de um plasmídio típico. O plasmídio contém um gene que confere resistência ao antibiótico ampicilina *(AmpR)* e uma região *polylinker* contendo aproximadamente 10 sítios de reconhecimento de enzimas de restrição, que servem como sítios para a inserção de DNA-alvo. O plasmídio também contém a ORI, o sítio para a origem da replicação de DNA.

Após a transformação, as células são deixadas a replicar, normalmente em uma placa *standard* de ágar contendo um antibiótico apropriado (Fig. A2.5B) para matar as células que não são portadoras do plasmídio contendo o gene de resistência ao antibiótico. Este processo de seleção ou de triagem, com base na resistência a antibióticos, é um passo importante devido à baixa eficiência da captação do DNA plasmídico pelas bactérias. As colônias (clones ou células únicas) são então "repicadas" e transferidas para tubos para o crescimento em cultura líquida e uma segunda fase de aumento exponencial em número de células. Tal trabalho é feito automaticamente em sistemas de microplacas, de maneira que, a partir de uma única célula e de uma única molécula de DNA, um número extremamente elevado de células contendo plasmídios recombinantes múltiplos e idênticos possa ser gerado em um intervalo de tempo relativamente curto (Fig. A2.6). A recuperação do DNA plasmídico é fácil porque se trata de um círculo pequeno, covalentemente intacto, prontamente separado do DNA cromossômico bacteriano por uma diversidade de técnicas.

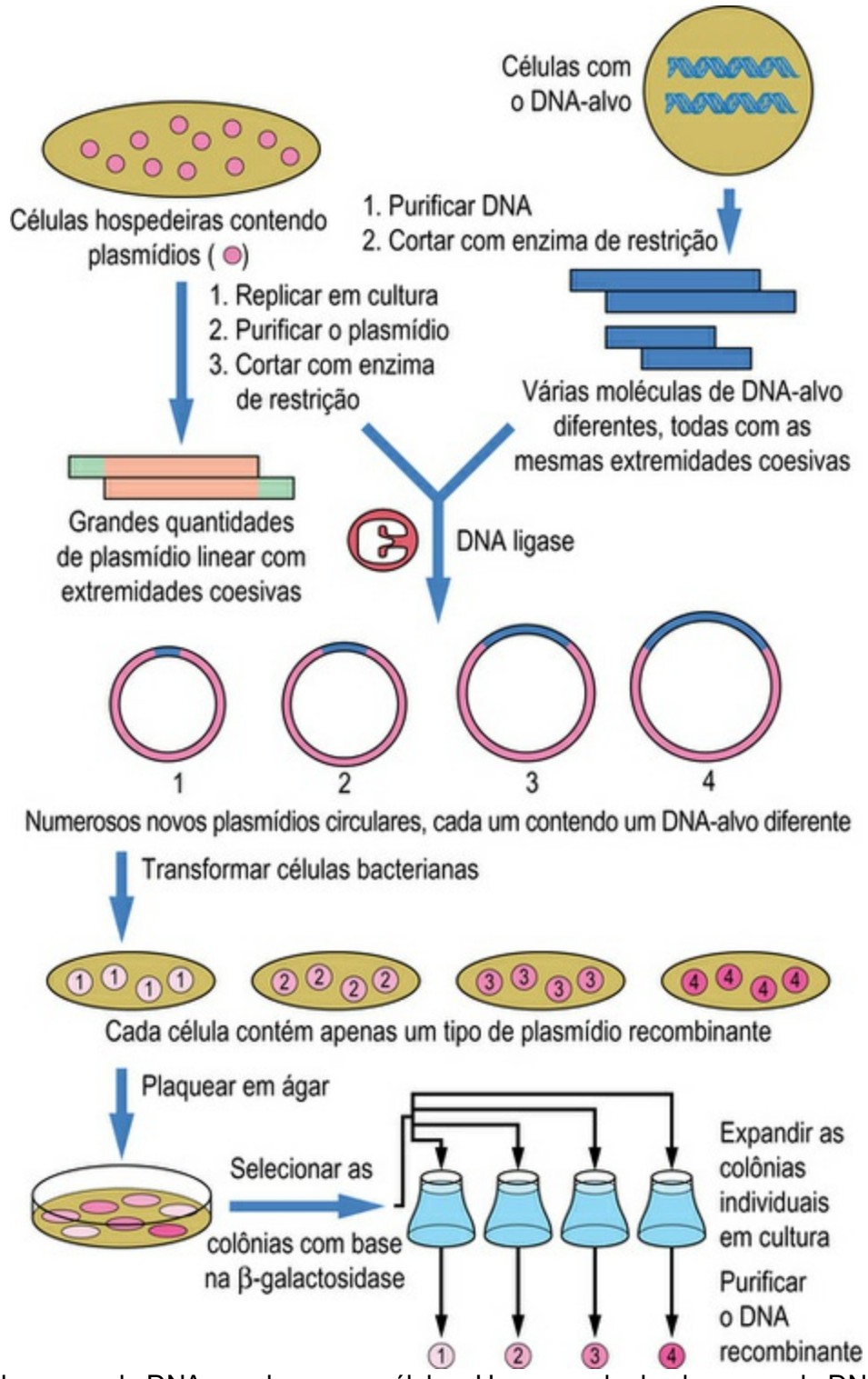


FIG. A2.6 Clonagem de DNA com base em células. Um exemplo da clonagem de DNA genômico usando células bacterianas. Em geral, cada bactéria transformada captará apenas uma única molécula de plasmídio. Assim, as colônias de bactérias individuais conterão muitas cópias idênticas de apenas um DNA recombinante particular.

A célula bacteriana é, então, crescida em cultura e a proteína-alvo é recuperada após a lise das células. Por outro lado, o plasmídio pode codificar uma proteína com uma sequência-sinal, de modo que ela seja secretada para o meio; a sequência-sinal seria removida posteriormente.

A tecnologia de produção de proteínas farmacêuticas é um processo complexo, envolvendo múltiplos passos, muitas vezes protegido por segredos comerciais. Para a síntese bacteriana da insulina recombinante (Quadro na página a seguir), por exemplo, não existe um gene ou mRNA para a sequência da insulina — a insulina é secretada como

pré-proinsulina, a qual é processada nas células β-pancreáticas para originar o hormônio secretado (Cap. 21). A síntese da insulina humana em um sistema bacteriano poderá envolver a incorporação do gene da pró-insulina em um plasmídio, a transformação de um hospedeiro bacteriano, a síntese da pró-insulina, a formação espontânea de ligações dissulfeto cruzadas, o processamento por endopeptidases para remover o peptídio C e, então, o enovelamento para produzir a molécula de insulina ativa. O processamento proteolítico poderá ocorrer na célula ou após isolamento da pró-insulina; já o processamento intracelular requerer a codificação da protease no plasmídio bacteriano. Pode-se contar, ainda, com outras estratégias, como a síntese das cadeias A e B em hospedeiros bacterianos separados, seguida da associação extracelular para formar o hormônio ativo. Pode ser igualmente possível desenhar um produto proteico que seria secretado pela célula bacteriana e, seguidamente, processado *ex vivo* para remover a sequência secretora e o peptídio C.

Diretrizes Futuras

A clonagem de DNA é um campo em rápida evolução na investigação biomédica e na medicina moderna. É a metodologia básica para a produção de organismos geneticamente modificados (GMO), incluindo produtos agrícolas e animais transgênicos e *knockout*. Sistemas mais sofisticados de expressão eucariótica, como células tumorais humanas, ovos de galinha e células vegetais, são agora comumente utilizados para a produção de proteínas farmacêuticas. Em alguns casos, essas células são alvo de engenharia para conter enzimas processadoras específicas, como as glicosiltransferases, para a modificação pós-traducional da proteína. A β-glicosidase usada para a terapia de substituição enzimática na doença de Gaucher (Cap. 28) é produzida em células de ovário de hamster chinês (CHO) sujeitas à bioengenharia. A enzima secretada a partir dessas células contém um sinal de manose-6-fosfato, de modo a ser captada pelos lisossomos após injeção intravenosa. As proteínas *humanizadas* podem também ser sintetizadas em células murinas e, em seguida, processadas por glicosidases e/ou glicosiltransferases, originando uma proteína com as modificações pós-traducionais apropriadas para uso no plasma ou em células humanas. Em um futuro não muito distante, talvez seja possível contornar tudo isso por terapia gênica, ou seja, por incorporação do gene de interesse diretamente nas células humanas relevantes, usando vetores virais. Apesar de todos esses avanços, a ideia fundamental de inserir uma porção exógena de DNA em um sítio de restrição particular de um plasmídio ou de um vetor viral continua completamente relevante nos dias que correm.



Quadro clínico

Produção de proteínas recombinantes: insulina

Uma menina de 13 anos foi admitida no hospital com desidratação, vômito e perda de peso. Seu nível sanguíneo de glicose era de 19,1 mmol/L (344 mg/dL) e apresentava

cetonúria. Foi feito um diagnóstico de diabetes melito tipo 1. Ela iniciou tratamento com insulina humana recombinante, foi reidratada (Cap. 21) e recuperou-se rapidamente.

Comentário

Antes do advento da tecnologia do DNA recombinante, a terapia com insulina envolvia a utilização de insulinas animais, mais comumente provenientes de porcos ou bovinos, que eram quimicamente similares, mas não idênticas, à insulina humana. Como resultado dessas diferenças, as insulinas animais levavam frequentemente ao desenvolvimento de anticorpos, que reduziam a eficácia da insulina e podiam levar a falhas no tratamento.

A insulina foi a primeira molécula humana clinicamente importante a ser produzida por meio da tecnologia do DNA recombinante. Após a clonagem do gene humano da insulina, foi possível a produção em larga escala de insulina humana pura, inserindo o gene clonado em um sistema de amplificação com base em células. Foram produzidas grandes quantidades de cópias de genes da insulina, as quais eram então expressas em bactérias ou leveduras, e a insulina purificada resultante era disponibilizada para uso no tratamento dos pacientes diabéticos. Desse modo, a insulina recombinante humana substituiu largamente a insulina animal no tratamento do diabetes. Outros peptídios humanos recombinantes importantes usados clinicamente são o hormônio do crescimento, a eritropoetina e o hormônio da paratireoide.



Quadro de conceitos avançados

Sistemas de vetores para a clonagem de fragmentos grandes de DNA

Um fator fundamental nas manipulações de DNA recombinante é o tamanho do DNA-alvo. Os plasmídios bacterianos convencionais, embora de uso conveniente, são limitados no que diz respeito ao tamanho da inserção que podem aceitar; 1-2 kb é o tamanho comum da inserção, com um limite superior de 5-10 kb. Alguns vetores plasmídicos modificados, chamados **cosmídeos**, podem aceitar fragmentos maiores de DNA de até 20 kb. Outro vetor comumente usado e que é capaz de aceitar fragmentos de DNA maiores é o **bacteriófago lambda** (λ). Essa partícula viral contém um genoma de DNA em cadeia dupla, empacotado em um revestimento proteico. O fago λ pode infectar células de *E. coli* com elevada eficiência e introduzir seu DNA na bactéria. A infecção leva à replicação do DNA viral e à síntese de novas partículas virais, que podem então lisar a célula hospedeira e infectar as células vizinhas para repetir o processo. O DNA viral é, então, reisolado para obter o DNA recombinante.

Podem ser clonados fragmentos ainda maiores usando cromossomos modificados, provenientes tanto de bactérias **(cromossomos artificiais bacterianos, BACs)** quanto de leveduras **(cromossomos artificiais de leveduras, YACs)**. Tais vetores podem acomodar fragmentos de DNA até 1-2 Mb. Os BAC foram particularmente importantes na montagem da sequência do genoma humano.

Índice

Os números de página que terminam em q, f e t referem-se a Quadros, Figuras e Tabelas, respectivamente

A

abciximab, 72

abetalipoproteinemia, 124q, 225q

acarbose, 289

acetaldeído, 62

acetaminofeno, 399

 overdose, 400q

acetilação, 477

acetil-coenzima A (acetil-CoA)

 ácidos graxos de cadeia ramificada, 185

 carbonos, 176f

 carboxilação em malonil-CoA, 191–192

 como ponto de partida para a síntese de ácidos graxos, 191

 como ponto de partida para a síntese de colesterol, 202

 como produto comum das vias catabólicas, 170

 estrutura, 171f

 excesso, em jejum ou inanição, 187

 oxidados em, 185

acetil-coenzima A (acetil-CoA) carboxilase, 2, 191–192

acetilcolina (ACh), 560–561, 568, 569f

acetil transacilase, 192–193

acidemia, 339

ácido γ-aminobutírico (GABA), 556

 transmissão sináptica, 570

ácido araquidônico, 548

ácido aspártico, 7, 12

ácido, definido, 339

ácido desoxirribonucleico (DNA) *See* DNA

ácido di-hidro-orótico, 411–412

ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), 31

ácido fólico/folato

deficiência, 134
e vitamina B^{12}, 133
necessidades de ingestão adequada na concepção, 134
reações de transferência de um único carbono, 133
reciclagem, 415q
síntese de DNA, 133
uso de análogos estruturais, 133
ácido glutâmico, 7, 12
ácido hialurônico, 387
ácido linoleico, 298
ácido lipoico, 174f
ácido mevalônico, 202
ácido oleico, 297
ácido palmítico, 297
ácido pantotênico, 134
ácido ribonucleico mensageiro (mRNA), 429
elongação, 433–434
eucariotos, 431–432
expressão gênica, 453, 455, 473
iniciação, 433
procariotos, 431–432
regulação da tradução pelo estado do ferro, 463f
splicing alternativo, 461
terminação, 434–435
transcrição, 432–435
ácido ribonucleico *See* RNA (ácido ribonucleico)
ácidos biliares
biossíntese de colesterol, 207–209
estrutura, 208f
metabolismo do colesterol, 398
primários, sintetizados no fígado, 207–208
secundários, sintetizados no intestino, 209
acidose, 336q, 339–341
definida, 339
metabólica, 339–341
respiratória, 339
acidose metabólica, 339–341
acidose respiratória, 339
ácidos fitânicos, α-oxidação, 186f
ácidos graxos, 24
acetil-CoA, sintetizada, 191

ácidos ω-3 ou ω-6 poli-insaturados, 297
adição a resíduos de cisteína, 477
alongamento, 195
alterações na expressão enzimática, regulação do armazenamento de substratos energéticos, 193q
armazenamento, 264
 e transporte, 197
ativação
 para transporte para a mitocôndria, 182
 pela acil-CoA sintase dos ácidos graxos, 183f
 síntese de triglicerídios requerida, 121
biossíntese e armazenamento, 191–198
cadeia curta
 produzidos no intestino grosso a partir de carboidratos não digeridos, 121q
 reabsorção, combinada com a secreção de bicarbonato, 115
cadeia longa, 33, 183f
cadeia média, oxidação comprometida, 185q
características gerais, 24
catabolismo peroxissomal, 184–185
comprimento, 182
comprimento da cadeia, 121
de cadeia ímpar, 185
de cadeia ramificada, oxidação a acetil-CoA e propionil-CoA, 185
deficiência de acil-CoA desidrogenase dos ácidos graxos, 185q
dessaturação, 196
essencial, 196, 298
ésteres, armazenados, 264
estrutura e ponto de fusão, 24, 25t
insaturados, 24, 185, 297 *See also* metabolismo oxidativo
lançadeira da carnitina, 182
ligações duplas, 24
livres, transporte entre órgãos e tecidos, 214
metabolismo das quatro classes, 183t
molécula, montagem até ao comprimento de 16 carbonos, 192–193
não passíveis de funcionarem como precursores da síntese de glicose, 167
oxidação, 183–185
poli-insaturados, 24, 297
saturados, 24, 297
sintase de ácidos graxos, 192–194
síntese, 191–194, 207
síntese endógena, derivados, 197
triacilgliceróis (triglicerídios), síntese, 197

vias de oxidação alternativas, 185
β-oxidação, 184f, 186q
ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)
produzidos no intestino grosso a partir de carboidratos não digeridos, 121q
reabsorção, combinada com secreção de bicarbonato, 115
ácidos graxos de cadeia longa (LCFA)
e albumina, 33
transporte para a mitocôndria, 183f
ácidos graxos essenciais, 196, 298
ácidos graxos insaturados, 24, 185, 297
ácidos graxos monoinsaturados, 24
ácidos graxos ômega-3, 235
ácidos graxos polinsaturados, 24, 297
ácidos graxos saturados, 24, 297
ácido siálico, 362
síntese com aminoaçúcares, 362f
ácidos nucleicos, 2, 407–408, 413
ácido desoxirribonucleico (DNA), 418–427
ácido ribonucleico (RNA), 429–440
ácido úrico
excesso, causador de gota, 414q
fontes e eliminação, 408–410
metabolismo, 408–411
ácido uridina difosfoglicurônico (UDP-GlcUA), 359
acidúria dicarboxílica e β-oxidação de ácidos graxos, 186q
acondroplasia, 548q
acoplamento excitação-contração, músculo, 255–257
actina, 252–253
açúcares
ciclização, 22
da dieta, 357–358
e glicose, 357 *See also* glicose
exemplos, encontrados em tecidos humanos, 24f
interconversões, 357–358
ligados a aminoácidos específicos em proteínas, 353–355
simples, nomenclatura e estrutura, 21–22
vias do metabolismo de nucleotídios, 359–362
adenilato ciclase, 541–542
adenina fosforibosil transferase (APRT), 408
adiponectina, 293
ADP-ATP (proteína transportadora), 109

adrenalina *See* epinefrina
adrenoleucodistrofia, 88q
adressinas vasculares semelhantes à mucina, 505
afinidade da hemoglobina com o oxigênio, modulação alostérica, 46–48
agentes antivirais, 64q
agentes caotrópicos, 13
agentes quimioterápicos, 425f
agregometria por transmissão de luz (LTA), 77
água
 balanço diário, 325f
 e metabolismo do sódio, 330f
 excesso e déficit, 330
 processamento renal, 313f
 reabsorção, 311
água e eletrólitos
 causas de perda, 113q
 homeostasia *See* homeostasia de água e eletrólitos
 processamento no trato gastrintestinal, 111–115
 transporte no intestino, mecanismos, 113–115
alanil-alanina, 23q
alanina, 23q, 165, 237q, 245
 aminoácidos, classificação, 6, 10f
 como ponto de partida para a gliconeogênese, 273–274
alanina aminotransferase (ALT), 172, 401
albinismo, 249q
albumina, 32–33, 39, 287, 491
alça de Henle, 313
alcalose, 339
alcalose metabólica, 339, 341q
alcalose respiratória, 339, 340q
alcaptonúria (doença da urina preta), 248
álcool desidrogenase (ADH), 400
alcoolismo
 anormalidades lipídicas, 197q
 deficiência de tiamina, 130, 173
álcool, metabolismo, 399–400
aldeído desidrogenase (ALDH), 400
aldo-hexoses, 21
aldolase A e B, 358
aldosterona, 328–330
alergia a amendoim, 508q

alimentos
conteúdo energético, 94, 95t
regulação da ingestão, 291–292, 295t *See also* carboidratos lipídios proteínas
alvos quimioterápicos, 415q
amidas, 11
amido, 21, 116–118
amidofosforribosil transferase, 408
amilase, 118q
amiloidose, 565q
aminoácidos, 2, 7, 20, 236–250
acídicos, 7
alifáticos, 6
aromáticos, 7f, 247f
básicos, 8
biossíntese, 246
cadeia peptídica, características de carga e polaridade, 11
catabolismo dos aromáticos, 247f
classificação
baseada na estrutura química, 8
baseada na polaridade das cadeias laterais, 8
como moléculas efetoras ou precursoras, 248t
como percursores de compostos essenciais, 246
como ponto de partida para a gliconeogênese, 165
contendo enxofre, 8
de cadeia ramificada, degradação, 246f
defeitos metabólicos, rastreio, 244q
deficiências da descarboxilase aromática, 559q
degradação, 238–244, 246f
desaminação, 238f
equação de Henderson-Hasselbalch, e valores de pK_a, 10
essenciais da dieta, 248t
estado de ionização, 8
estereoquímica, 5
estrutura, 5f
estrutura química, classificada, 8
glicogênicos ou cetogênicos, 244–245
glicose, conversão, 264
glutamina, papel central, 240
grupos funcionais, 8t
hidrofóbicos, 6, 33, 41
ligações com açúcares, em glicoproteínas, 354t

metabolismo
ciclo da ureia, 395
doenças hereditárias, 247–249
esqueleto carbonado, 244–245
piridoxina, 131
relações metabólicas, 237f
vias metabólicas centrais, 245f
não essenciais, origens, 247t
não proteicos, 7q
neurotransmissores, 555
peptídios e proteínas, 13
polares, 41
polares neutros, 7
polaridade das cadeias laterais, classificada, 8
processamento renal, 314–315
prolina, 8
proteínas, encontradas, 5, 6t
sequência linear, 11
sequências de globina, conservação, 41f
tampões, 10
titulação, 10f
uso como energia após conversão em glicose, 264 *See also* proteínas
valores de pK_a para grupos ionizáveis, em proteínas, 9t
transporte ativo para células epiteliais intestinais, 124q
aminoácidos acídicos, 7
aminoácidos alifáticos, 6
aminoácidos aromáticos, 7f
catabolismo, 247f
deficiências de descarboxilase, 559q
aminoácidos básicos, 8
aminoácidos contendo enxofre, 8
aminoácidos não proteicos, 7q
aminoacil-tRNA sintetases, 432
aminoaçúcares, 362
aminopterina, 415q
aminoterminal (*N*-terminal), 10
amônia
ciclo da ureia, 395
depuração plasmática comprometida, 395
reação da glutaminase, originada, 338
amostras lipêmicas, 59

AMP cíclico (AMPc), 541
amplitude máxima (MA), traçado de tromboelastografia, 76f
analisador da função plaquetária, 77
análise-alvo, metabólito, 484
análise cromossômica por microarranjos (CMA), 468
análise do perfil, metabólitos, 484
análogos nucleosídios, como agentes antivirais, 64q
anapleróticas (reações de preenchimento), ciclo do ácido tricarboxílico, 179
androgênios, 211
 excesso, 530
anel β-lactama, 62f
anemia
 deficiência de ferro, 100q
 deficiência de piridoxina, 131
 falciforme, 442q
 hemolítica, 153q
 intervalos de referência, 604t
 megaloblástica, 134
 perniciosa, 132
anemia de deficiência de ferro, 100q
anemia falciforme (AF), 51
 anemia, 442q, 576q
 crises vaso-oclusivas, 52q
anemia hemolítica, 153q
anemia megaloblástica, 134
anemia perniciosa, 132
anidrase carbônica I, 10, 334
β-anômero, 22
anormalidades da síntese de esteroides, 212q
anquirina, 29q
antibióticos, 83q, 133, 435q, 436q
antibióticos poliênicos, 83q
anticoagulantes, 31, 76–78, 81, 389q
anticorpos, resposta imune, 507–509 *See also* antígeno(s)
antidepressivos tricíclicos (ADTs), 558
antidiabéticos, 288–289
antígeno(s)
 de tripanossomas, superfície variável, 373q
 grupo sanguíneo ABO, 376–377
 grupo sanguíneo de Lewis, 377
 ligação, 501

reação, resposta e eliminação, 505
receptor antigênico das células B (BCR), 503
receptor antigênico das células T (TCR), 502
receptores, imunidade inata e adaptativa, 499t
reconhecimento, 500
moléculas envolvidas, 501–502
antígenos dos grupos sanguíneos, 376–377
antígenos próprios, 508
anti-histamínicos, 246q
anti-inflamatórios não esteroidais (AINE), 62
antimicina, 108f
antioxidantes
avaliação do risco cardiovascular, 235
defesas, 2
defesas antioxidantes, 490–493
envelhecimento, 600
glutationa, 152f
vitamina E, 128
antiplaquetários, 72, 399
α-1-antitripsina (A1AT), 491
antitrombina, 79
deficiência, 79q
aparelho de Golgi, 363, 383
apoenzimas, 56
apolipoproteínas, 215–216, 218
apolipoproteína A, 215
apolipoproteína B, 217
apolipoproteína C, 218
apolipoproteína E, 217
apoptose, 581–582, 584q
aquaporinas, 115, 329
argatroban, 78
arginina, 7q, 12, 243–244
armazenamento e síntese de carboidratos
glicogênese
regulação, 163
vias, 155–156
glicogênio, estrutura, 154
glicogênio sintase, inibição máxima, 163q
glicogenólise, 161–163
gliconeogênese, 164–168

glucagon, mecanismo de ação, 158–160
insulina, mecanismos de ação, 164f
no fígado e no músculo, 154
regulação hormonal da glicogênese hepática, 157–158
arsênio, 146
artrite reumatoide (AR), 508
ascorbato, atividade antioxidante, 492f
asparagina, 7, 12
aspartato, 245
aspartato aminotransferase (AST), 401
aspirina, 71q, 72, 80–81
astrócitos, 566–567
ataxia-telangiectasia, 581q
ATCase, regulação alostérica, 63f
aterogênese, 219, 226–232
aterosclerose, 226–227, 230q, 232
aterotrombose, 68, 226
ativador do plasminogênio tecidual (tPA), 79
ativador do plasminogênio urinário (uPA), 80
ATPase de sódio-potássio, Na^+/K^+-ATPase (adenosina trifosfatase de sódio-potássio)
autofagia, 581, 583–586
autofosforilação, 538–539
autoimunidade, 509
doença autoimune, diabetes tipo 1, 278
patologia endócrina, 518
autorradiografia, 573
autotolerância, 500
avaliação do risco cardiovascular, 37, 232–235
definição de risco cardiovascular, 234q
risco global, 233
azida, 107–108

B

baço, 504
inchaço, 72
bacteriorodopsina, 29q
balsas lipídicas, 29
banco de dados Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), 467
barbitúricos, 33
barreira de filtração glomerular, 309–310
barreira hematoencefálica (BHE), 85q, 519

neuroquímica, 564–565
barreira sangue-LCR, 564
base de Schiff, 22, 400
benzodiazepina, 89q
beribéri, como doença de deficiência, 130
bicarbonato
processamento pelos rins 338-339
secreção, 115
tampões, 332–334
2, 3-bifosfoglicerato
efeito, 47–48
síntese, 142, 149–150
bifosfonatos, 351f
bilirrubina, 33, 396–397
bioenergética, 94–110
biomarcadores
envelhecimento, 598q
e o sangue, 38
estado nutricional, 299–300
metabolômica, 484
risco de desnutrição, 300
biomembranas *See* membranas, biológicas
bioquímica
e medicina clínica, 1
razões para o estudo, 1
biotina, 131
bivalirrudina, 78
bloqueio do malonato, 178q
bomba de prótons, gástrica, 90, 91q
bombas ATPases (P-ATPases), 86
bombas de íons, transporte membranar, 86
botulismo, 571q
brometo de cianogênio, 18
α-bungarotoxina, 89

C

cadeias polipeptídicas, 57q
cádmio, 140
calcidiol, 346
cálcio, 135–136
distúrbios do metabolismo, 349–350

excreção, 348
gatilho do acoplamento excitação-contração (músculo), 257
homeostasia, 345–348
segundos mensageiros, 545
soro, 345
cálcio sérico, 345
calcitonina, 347
calcitriol, 346–347
cálculos biliares, 210q
calmodulina
efetores-alvo, 545–548
e segundos mensageiros, 543
estrutura e função, 547f
canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (VDCCs), 88–90
canais iônicos
movimento de eletrólitos, 323
transmissão sináptica, 570
canal de Cl^- (ClC), 90
canal de potássio da medula renal externa (ROMK), 90
câncer, 2, 585–587
e estilo de vida, 307
e suplementação vitamínica, 135
fígado, 405
glicólise em células tumorais, 149q
mama, 484
mTOR, 588q
mudanças na composição/estrutura dos açúcares como marcadores, 367q
mutações, determinação das terapias contra o câncer, 590q
novos alvos proteicos para contrariar a recidiva e a resistência a fármacos, 427q
patologia endócrina, 518–519
promotores tumorais, 587–589
próstata, 484
proteassomas, inibição para tratamento, 451q
síndromes hereditárias, 589t
terapia farmacológica, 133
câncer da próstata, biomarcadores, 484
câncer de mama, biomarcadores, 484
carbamoil fosfato, síntese, 241q, 248t
carboidratos, 2
açúcares, 21–22
armazenamento e síntese *See* armazenamento e síntese de carboidratos

classes de nutrientes, 296–297
complexos *See* carboidratos complexos
da dieta, estrutura, 117f
digestão e absorção, 116–120
dissacarídio, 22–23, 25f
e proteínas
interações, 365–367
ligação, 21
frutose, 23f
glicanas, 23q
glicoproteínas, função, 354t
glicose *See* glicose
hexoses, estruturas, 22f
metabolismo *See* metabolismo de carboidratos
monômeros, transferência através da membrana, 118–120
não digeridos, ponto de partida para a produção de ácidos graxos de cadeia curta no intestino grosso, 121q
oligossacarídios, 22
polissacarídios, 22–23, 25f, 118q
reservas energéticas, distribuição pelos tecidos, 155t
carboidratos complexos
ácido siálico, 362
açúcares da dieta, 357–358
aminoaçúcares, 362
estruturas e ligações, 353–356
glicoproteínas *See* glicoproteínas
N-glicanas
estrutura dependente do complemento enzimático da célula, 357q
montagem começando no retículo endoplasmático, 362
O-glicanas, 363
oligossacarídios, biossíntese, 362–363
vias metabólicas de açúcares nucleotídicos, 359–362
carboxilação/reações de carboxilação
acetil-coenzima A, 191–192
biotina, 131
tiamina (vitamina B_1), 130
vitamina K, 129f
carboximetilcelulose, 15
cardiolipina, 27
cárie dentária e glicólise, 148f
cariotipagem, 467–468, 589

cascata de coagulação, 74
cascatas de sinalização
 amplificação de sinais iniciada por ligação a receptores, 543, 544f
 ciclo celular, 574–577
caspases, 583
caspases iniciadoras, 583
catabolismo
 de aminoácidos aromáticos, 247f
 de catecolaminas, 558f
 de nucleotídios de pirimidina, 415
catabolismo peroxissomal, ácidos graxos, 184–185
catecolaminas, 556–558
 transmissão sináptica, 567–569
$CD8^+$, e células T citotóxicas, 507
cefalina (extrato fosfolipídico cerebral), 74
cefalosporina, estrutura nuclear, 62f
cegueira noturna, deficiência de vitamina A, 126
células
 biomembranas *See* membranas, biológicas
 células B *See* células B
 células T *See* células T
 ciclo *See* ciclo celular
 como ponto de partida para o efluxo de colesterol, 207
 epitelial intestinal, transporte ativo de aminoácidos, 124q
 glicólise em células tumorais, 149q
 marcadores de superfície, 501
 mecanismos de crescimento e reparação, 2
 mecanismos de sinalização, 537f
 morte *See* morte celular
 músculo estriado, 259
 músculo liso, 230
 proteção contra osmolalidade e alterações de volume, 324
 regulação da proliferação e crescimento, 574–575
 resposta imune inata, 498–500
 sistema nervoso, 566–567
células apresentadoras de antígenos (APCs), 504
células B
 linfócitos, 451q, 507
 maturação, 504
 receptor antigênico das células B (BCR), 503

seleção clonal, 505f
subtipos, 508
células dendríticas, 497, 504
células hematopoiéticas, defeitos na ancoragem de GPI, 373q
células *natural killer* (NK), 497
células parietais, 115q
células parietais gástricas, 91f
células T
células T citotóxicas, e CD8+, 507
células TH1 e TH2, 506–507
células TH17, 507
células T reguladoras (Treg), 507
e células apresentadoras de antígeno, 504–505
linfócitos T, 504
receptor antigênico da célula T (TCR), 501–502
resposta, 506–507
subtipos de células T CD4+ auxiliares, 506
células T citotóxicas (CTL), e CD8, 507
células tumorais, glicólise, 149q
celulose, 21
cérebro
barreira hematoencefálica *See* barreira hematoencefálica (BHE)
ceruloplasmina, 33, 34f, 39
cetoacidose diabética, 279–281, 288
3-cetoacil sintase, 192–193
cetogênese
a partir da acetil-CoA, 187f
como via metabólica exclusiva do fígado, 186–188
defeituosa, 188q
regulação, 188–189
α-cetoglutarato, 239f
α-cetoglutarato desidrogenase, 176–177
cetonúria, 188q
chaperonas, 433
cianeto, 107
ciclo alimentação-jejum, 272
ciclo celular, 573–577
em eucariotos, 422–424
fases, 422f, 574f
mudança do paradigma clássico, 580q
regulação, 578–579, 581

subversão, 589
ciclo da glicose-alanina, 274, 275f
ciclo da ureia
e amônia, 395
e ciclo do ácido tricarboxílico, 242f
enzimas, 242t
fontes dos átomos de nitrogênio, 240f
regulação, 243
ciclo de Cori, 274, 275f
ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), 2, 170–173, 242f
anaplerótico (reações de preenchimento), 179
bloqueio do malonato, 178q
defeitos metabólicos, 172
e enzimas, 175–178
funções, 170
interconversão de combustíveis e metabólitos, 170
natureza anfibólica, 171f
regulação, 180–181
rendimento energético, 179
ciclo menstrual, 530–531
ciclo-oxigenase, 62
cinase dependente de ciclinas (CDK), 578–579
cinase ERK-MAPK, 576f
cinase regulada por sinal extracelular (ERK), 575–577
cinases sensoras, 580
cinética, enzima, 56–57, 59, 66
cininogênio de alto peso molecular (HMWK), 74
circulação êntero-hepática, 209
cirrose, 402q
cirurgia bariátrica, 304
cistamina, 84
cistatina C, 317
cisteína, 8
cistina, 84q
cistinose, 316q
cistinúria, 249q
citocinas, 496–497
aterogênese, 229f
papel, 228f
secreção pelo tecido adiposo, 293
sinalização do receptor de citocinas, 577–578

citocromos, 103q
citocromo *c*, 102
citocromo *c* redutase, 101–102
citocromo P-450, 398–399
citocromo P-450 mono-oxigenases, 202
citoglobina, 49
citomegalovírus (CMV), 64q
citrato, 31
citrato sintase, 175
citrulina, 7q
clivagem proteolítica, 477
clopidogrel, 72
cloreto, 135–136
osmolalidade, 323–324
transporte, 113
Clostridium botulinum, 571q
coagulação; ver em sanguecoagulação intravascular disseminada, 72
cobre, 138–139
deficiência, 103q, 139
e doença de Wilson, 34q
excesso, 139
código genético, 441–442
coeficiente de Hill, 44
coenzima A (CoA), 134
coenzima Q_{10}, 98
deficiência, 100q
transferência de elétrons para o complexo III, 101
coenzimas, 2
cofatores, 56
papel, 56
redox, estrutura, 99f
reduzidas, 97–99
síntese mitocondrial de ATP, 97
solúveis, 56 *See also* acetil-coenzima A (acetil-CoA) enzimas
transdução de energia, 98
coestimulação, 501, 504
cofatores, 1
colágenos
arranjo um quarto alternado de moléculas em uma fibrila, 381f
biossíntese, 383f

e matriz óssea, 343
e parede vascular, 70–72
estrutura em tripla hélice, 380
estrutura tridimensional, 381f
formação de ligações cruzadas, 384f
formadores de fibrilas, 381
matriz extracelular (MEC), 380–384
não fibrilares, 381–382
proteínas, 12q, 380
tipo IV, 382
tipos, 380–382
colesterol, 24, 200–213
absorção intestinal, 201
alteração da fluidez de membranas, 201
atividade membranar, 200
biossíntese, 202–207
como precursor de todos os hormônios esteroides, 209
e ácidos biliares, 207–209
e hormônios esteroides *See* hormônios esteroides
essencial para a estrutura e função celulares, 200
estrutura, 200–201
excreção, 209
fornecimento, 205
inibição, 234
intervalos de referência, 604t
intracelular, 205, 206f, 218, 221
livre e esterificado, 201
metabolismo, 398
remoção, 207, 221
significado clínico, 200
síntese, 55, 201f
síntese de novo, 205
transporte reverso, 221–222
condições que afetam, 226
colesterol intracelular, 205t
regulação da concentração, 221f
regulação dos receptores de lipoproteínas, 218 *See also* colesterol
colestiramina, 209
cólon
absorção e secreção de potássio, 113–115
ácidos graxos de cadeia curta, reabsorção, 115 *See also* trato gastrintestinal (GI) intestinos intestino grosso

aquaporinas, ação, 115
compartimentos de água corporal, 320–323
complexo de ataque à membrana (MAC), 497
complexo enzima-inibidor (EI), 62
complexo enzima-substrato, 56, 62
complexo esclerose tuberosa (TSC), 588
complexo hemoglobina- haptoglobina, 34q
complexo I (NADH: ubiquinona oxidorredutase), 100
complexo II (succinato: coenzima Q redutase), 100
complexo III (ubiquinona citocromo c redutase/QH2 citocromo c redutase), 101–102
inibição, 108f
complexo IV (citocromo c oxidase/citocromo oxidase), 102–104
inibição, 107, 109f
regulação da fosforilação oxidativa, 109
complexo piruvato desidrogenase (cPDH), 172–173
ácido lipoico, 174f
deficiência, 174q
mecanismo de ação, 173f
regulação, 179f
complexo principal de histocompatibilidade (MHC), 502–503
complexos ferro-enxofre, 100q, 101f
complexo V (ATP sintase), 105f
como exemplo da catálise rotacional, 104
compostos anfipáticos, perturbação da membrana, 29q
concentração do íon hidrogênio *See* equilíbrio acidobásico
condições alérgicas
alergia a amendoim, 508q
glutamato monossódico, reação, 239q
histamina, 246q
constantes de equilíbrio, reações metabólicas, 95
contagem sanguínea completa (CSC), 52q
conteúdo eletrolítico nos fluidos corporais, 325t
contração muscular
baixa intensidade, longa duração, 259
curta duração, alta potência, 258
modelo dos filamentos deslizantes, 255, 256f
processo contrátil, 255–257
controle respiratório
definição, 105–106
e regulação por retroalimentação, 109
coproporfiria hereditária, 397q

córnea, proteoglicanos, 389
cornificação/formação do envelope cornificado, 582
corpos cetônicos, 187f, 188q, 287
córtex adrenal, 210
cortisol
 biossíntese, 525
 distúrbios clínicos da secreção, 526–527
costicosteroides, 71, 211
creatina fosfato (creatina-P), 258f
creatinina, 7q, 317
creatinina sérica, 317
crises vaso-oclusivas, célula falciforme, 52q
cristalografia de raios X, 12, 19
cromatografia
 cromatograma, 18f
 de afinidade, 16
 líquida de alta eficiência, 16q
 troca de cátions, 18f
 troca iônica, 15–16
cromatografia de afinidade, 16
cromatografia de troca catiônica, 18f
cromatografia de troca iônica, 15–16
cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS), 38
cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), 16q, 17
 fase reversa, 18
cromatografia líquida-espectrometria de massa (LC-MS), 38
cromossomos
 DNA compactado, 421
 empacotamento, 422f

D

dabigatrano, 77
Dalton, lei de, 40
dano cerebral, depuração plasmática de amônia comprometida, 395
dano oxidativo, 426f, 490–491
deficiência de fator VIII, 64, 74, 76q
deficiência de fator XII, 74
deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase, 153q
deficiência de l-3-hidroxiacil-CoA desidrogenase (LCHAD), 189q
deficiência de lipoproteína lipase, 225
deficiência de neurotransmissores centrais, 559q

deficiência de sulfito oxidase, 13q
degeneração macular relacionada com a idade (DMRI), 439
demência, 598q
 deficiência de niacina, 131
depressão, como doença dos aminoneurotransmissores, 558q
depurinação, DNA, 426
dermatite, na deficiência de niacina, 131
desacopladores/proteínas desacopladoras (UCP), 106, 107f
desaminação oxidativa, aminoácidos, 238
descolamento do cristalino, homocistinúria, 13q
desidratação, 330q
7-desidrocolesterol, 345
7-desidrocolesterol redutase, defeito, 210q
desmosina, 385f
desnaturantes, 13
desnutrição, 300–303
desnutrição proteico-calórica, consequências, 302t
desordens do equilíbrio acidobásico, 334f, 339–341
 alcalose
 acidose, 339–341
 acidose respiratória, 336q
 alcalose metabólica, 341q
 alcalose respiratória, 340q
 causas, 340t
 classificação, 339
 compensação respiratória e metabólica, 333t
 definida, 339
 metabólica, 339, 341q
 mista, 341
 respiratória, 339, 340q
 simples versus mista, 341t
desoxinucletídios, 413–415
desoxirribonucleotídios, 413f
desoxi-TMP (TMP), 414–415
despolarização, 553
desvio do *trans*-metilglutaconato, 205q
diabetes insípido, 329
diabetes insípido nefrogênico, 329
diabetes juvenil de início tardio (MODY), 279
diabetes melito, 276–283
 acompanhamento (*follow-up*) clínico, 287

biomarcadores, 484
classificação, 278t
complicações macrovasculares, 283f
complicações microvasculares, desenvolvimento, 281–283
critérios de diagnóstico, 286t
dano vascular, 276–277
diabetes juvenil de início tardio (MODY), 279
diagnóstico e monitoramento dos pacientes, 284–287
doença autoimune, diabetes tipo 1, 278
e cardiopatia isquêmica, 281q
e doença cardiovascular, 281
hiperglicemia, 276–277
hipoglicemia, 284
metabolismo, 279–281
metabolismo de lipoproteínas, 225q
modulação da atividade de transportadores, 90q
monitoramento da glicose sanguínea, 65
obesidade e diabetes tipo 2, 278–279
sobrecarga de ferro, 487q
terapia farmacológica, 288–289
tipo 1, 278, 279, 287
tipo 2, 37, 278–279, 288–289
tratamento, 287–289
diabetes tipo 1, 278, 279, 287
diabetes tipo 2, 278–279
obesidade, 278–279, 303
terapia farmacológica, 288–289
diacilglicerol (DAG), 545
diarreia
deficiência de niacina, 131
má absorção, 124q
perda de fluidos e eletrólitos, 113q
tipos, 118q
dieta mediterrânea, 307
dietas pobres em carboidratos, 303, 307
difosfato de adenosina (ADP), 105f, 106
difosfato de uridina (UDP), 397
digestão
capacidade de reserva do trato gastrintestinal, 116
carboidratos, 116–120
como processo multiorgânico, 116f

como série sequencial e ordenada de processos, 115–116
definida, 115–116
enzimas, 63, 116
lipídios, 121
proteínas, 122–125
zimogênios, 116 *See also* trato gastrintestinal (GI)
digoxina, 89q
di-hidropiridina, 89
di-hidrotestosterona (DHT), 528
di-hidroxiacetona, 21
di-hidroxiacetona fosfato, 358
diltiazem, 89q
dímero D de fibrina, dosagem na DVT, 80q
dímero de timina, 425f
dióxido de carbono (CO_2), 2, 31, 47
dipiridamol, 72
disbetalipoproteinemia familiar, 225q
dislipidemias, 222
classificação fenotípica, 223t *See also* metabolismo de lipoproteínas
geneticamente determinadas, 223t, 225q
terapia farmacológica, 233–234
D-isômeros/L-isômeros, 5
dissacarídios, 22–23, 25f
digestão, 116–118
dissulfiram, 62
distrofias musculares, 252q, 386q
distúrbios da secreção de esteroides, 531
distúrbios hemorrágicos
deficiência de vitamina K, 129
hemofilia, 64q, 76q
relacionados com as plaquetas, 72
sangramento excessivo
causas congênitas e adquiridas, 70t
defeitos da adesão/agregação plaquetária, 72
defeitos da hemostase, 70
fatores de coagulação, deficiências congênitas, 74
distúrbios hepáticos
câncer, 405
características clínicas, 394f
classificação, 402–404
doença colestática, 402

doença hepatocelular, 402
genômica, 404–405
icterícia *See* icterícia
tempo de protrombina, 77
ditiotreitol, 8
diuréticos, 313
DNA (ácido desoxirribonucleico), 418–427
acesso a promotores, 460
aminoácidos codificados, 6
cadeias separadas, reassociação para formar DNA duplex, 420–421
clonagem baseada em células, 575–576
compactado em cromossomos, 421
dano
monitoramento, 580–581
oxidativo, 426f
tipos, 425
dano oxidativo, 426f
depurinação, 426
desaminação, 425
estrutura, 418–419, 422f
formas alternativas, regulação da expressão gênica, 419–420
genômico, 574
leitura de sequências, métodos NGS, 471
marcação das extremidades de sondas, 573
metilação, 460–461, 472f
mitocondrial, 421, 599q
modelo de Watson e Crick, 418, 419f
pareamento (*annealing*), 573
quebras na cadeia, 426
recombinante, 3
reparo, 424–427
defeitos, 596q
e longevidade, 594f
reparo de pareamentos incorretos (*mismatch repair*), 426
replicação por separação e cópia de cadeias, 423–424
satélite, 420–421
sequenciamento
alterações epigenéticas como traços hereditários que não se refletem, 471
método de terminação da cadeia de Sanger, 470f
métodos NGS, 471
síntese, 133, 423f

sítio de replicação, 423–424
sondas, 573–574
temperatura de *melting* (Tm), 573
DNA mitocondrial, 421
danos, 599q
DNA recombinante, 2, 573–577
DNA satélite, 420–421
doadores de metila, síntese de lipídios, 371f
doadores de sulfato, síntese de lipídios, 371f
doença aguda da montanha (DAM), 49q
doença cardíaca isquêmica e diabetes, 281q
doença cardiovascular (DCV)
arritmia cardíaca, 29q
cardiomiopatia, sobrecarga de ferro, 487q
e diabetes, 281q
e suplementação vitamínica, 135 *See also* infarto agudo do miocárdio
e via de transporte de combustível, 219
doença celíaca, 120q
doença colestática, 402
doença coronariana, prevenção, 305–307
doença da célula I, 366q
doença da urina em xarope de bordo (MSUD), 249
doença de Addison, 526q
doença de Alzheimer, 561
doença de Creutzfeldt-Jakob, 19q
doença de Fabry, 375t, 376q
doença de Gaucher, 375t
doença de Graves, 524q
doença de Hartnup, 84q
doença de Krabbe, 375t
doença de Menkes, 88q
doença de Paget, do osso, 351
doença de Parkinson, 243q, 561, 568–569
doença de Stargardt, 88q
doença de Tangier, 88q
doença de Tay-Sachs, 375t
doença de Von Gierke, 157q
doença de von Willebrand, 72
vWF (ligante), 73q
doença de Wilson, 34q, 88q, 405
doença hemorrágica do recém-nascido, 129

doença hepatocelular, 402
doença maligna *See* câncer
doença neurodegenerativa, estresse oxidativo, 598q
doenças de armazenamento lipídico, 375t
doenças de armazenamento lisossomal, 375
dopamina, 314f, 534, 558–559
 deficiência, 559q
 e receptores de serotonina, 560q
 no trato nigroestriatal, 559f
 transmissão catecolaminérgica, 568–569
duodeno, emulsão lipídica, 121

E

Eatwell Plate, 304, 306f
ECM *See* matriz extracelular (MEC)
edema
 diuréticos, 315q
 perda de proteína, 324q
 síndrome nefrótica, 37q
edema cerebral, 49
educação tímica, 500
efeito de Bohr, 46–47
EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico), 575–577
eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, 523–527
eixo hipotálamo-pituitária-gonadal, 527–529, 531
eixo hipotálamo-pituitária-tireoide, 520–523
eixos, sistema regulador hipotálamo-pituitária, 519, 520f
elastase, 55f, 60
elastina, 384–385
elemento de resposta antioxidante (ARE), 491q
eletroforese, 16, 32f
 gel bidimensional, 16
eletroforese de proteínas urinárias, 39
eletroforese diferencial em gel bidimensional (DIGE), 18
eletroforese em gel bidimensional de poliacrilamida (2D-PAGE), 19, 478–479
eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), 14f, 16
eletroforese sérica, 39
elétrons
 sistemas inibidores do transporte, 107
 transferência do NADH para a mitocôndria, 101–103
 transporte, 2

embolismo, 68
em crianças prematuras, vitamina K, 129
enantiômeros, 6f
encefalopatia causada pela amônia, 243q
encefalopatia espongiforme, 19q
endocrinologia
 avaliação bioquímica, 516–518
 distúrbios da secreção de esteroides, 531
 eixo da prolactina, 534–535
 eixo do hormônio do crescimento, 531–533
 eixo hipotálamo-pituitária- adrenal, 523–527
 eixo hipotálamo-pituitária- gonadal, 527–529, 531
 eixo hipotálamo-pituitária- tireoide, 520–523
 gravidez, confirmação bioquímica, 533q
 órgãos endócrinos não clássicos, 514q
 patologia, principais tipos, 518–519
 secreção do hormônio do crescimento, distúrbios clínicos, 533
 sistema regulador hipotálamo-pituitária, 519–520
 tecido adiposo, atividade endócrina, 296t
 testes endócrinos comumente usados (provocativos), 518t
 testosterona, 528–530 *See also* hormônios
endossomos, 86
endotélio
 dano endotelial, 71
 disfunção precedente de lesões ateroscleróticas, 228–229
 função, 227–232
 superfície antitrombótica, 71
energia
 ciclo do ácido tricarboxílico, 179 *See also* metabolismo
 e trifosfato de adenosina, 2, 96–97
 gasto, 294
 livre, 95, 170
 oxidação como fonte, 94–95
 regulação do armazenamento de substratos, 193q
 regulação do balanço pela dieta, 292–294
 transdução, 97f, 98
enfisema, 491q
engenharia de tecidos
 e matriz extracelular, 391q
 e substituição do músculo, 260–261
enolase, inibição pelo fluoreto, 147q

ensaio da creatina, 260q
ensaio de imunoabsorção ligado a enzimas (ELISA), 517f, 519
ensaio de mudança de mobilidade eletroforética (EMS), 458f
ensaio/reagente de glicose oxidase-peroxidase (GOP), 65, 66f
ensaios de cinética enzimática, 65–66
enterócitos, 113
envelhecimento, 2, 592–602
 biomarcadores, 598q
 curva de sobrevivência e taxa de mortalidade, 593f
 declínio em sistemas bioquímicos e fisiológicos, 593t
 definido, 592
 de sistemas complexos, 592
 e antioxidantes, 600
 intervenções antienvelhecimento, 600–601
 limite de Hayflick, 592
 modelos matemáticos, 593
 restrição calórica, 600–602
 senescência replicativa, 592
 sistema circulatório, 598q
 telômeros, 599q
 tempo de vida aumentado, modelos genéticos, 599
 teoria dos radicais livres, 595–597
 teorias, 594–598
 teorias biológicas, 594–595
 teorias mitocondriais, 597–599
 teorias químicas, 594–595
envenenamento por amanitina, 432q
envenenamento por etilenoglicol, 61q
envenenamento por inseticida, 64q
envenenamento por metanol, tratamento, 61q
enzima conversora da angiotensina (ECA), 61q, 91
enzimas, 54–65
 alongamento dos ácidos graxos, 195
 ciclo da ureia, 242t
 cinética, 56–57, 59, 66
 classificação, 56
 cooperatividade positiva e negativa, 64
 definição de atividade enzimática, 55–56
 determinação pela estrutura do sítio ativo, 55–56
 diagnóstico clínico, usadas, 56t
 digestão, 63, 116

dosagem de atividade em amostras clínicas, 59q
equação de Michaelis- Menten, 56–59
especificidade de reação, 55–56
especificidade de substrato, 55–56
estereoespecificidade, 176q
fármacos e venenos que inibem irreversivelmente, 62
fatores que afetam as reações, 54–55
glicólise, 149q
hepáticas, 398
hormônios, regulação, 270
inibição, 60–62
inibição competitiva, 61f
inibição do estado de transição e substrato suicida, 62q
inibição não competitiva, 62
isozimas da lactato desidrogenase, 57q
K_m (constante de dissociação), 58–61
lisossomais, 583–584
mecanismo de ação, 59–60
metabolismo de lipoproteínas, 219
pancreáticas, 121
perfil de reação para reações enzimáticas e não enzimáticas, 54f
pH, efeito, 55
proteína, alteração na quantidade, 193
proteolíticas, 123
reações enzimáticas, 54–56
regulação alostérica, 63, 65f
regulação de atividade, 63–64
ribozimas, 436q
temperatura, efeito, 54
unidade internacional (UI), 55
$V_{máx}$ (velocidade máxima), 58–62 *See also* coenzimas
enzimas citosólicas, 55
enzimas de restrição, 574
enzimas digestivas, ativação proteolítica, 63
enzimas lisossomais, 583
enzimas pancreáticas, 121
enzimas proteolíticas, 123
epidermólise bolhosa, 386q
epilepsia, neonatal, 562q
epinefrina
fígado, atuação, 269

metabolismo lipídico, regulação, 189f
mobilização do glicogênio hepático, 160
músculo, atuação, 269
neuroquímica, 569
neurotransmissores, 557–558
regulação do metabolismo lipídico, 189f
epitélio, células epiteliais intestinais, transporte ativo de aminoácidos, 124q
equação de Henderson-Hasselbalch, e valores de p$K\alpha$, 10
equação de Michaelis-Menten, 56–59
equilíbrio acidobásico, 332–342
ácidos produzidos no decurso do metabolismo, 332
bicarbonato, processamento pelos rins, 338
componentes respiratórios e metabólicos, 332–335
controle da frequência respiratória, 336f
equação de Henderson- Hasselbalch, 9
gasometria sanguínea, 335
inter-relação de componentes respiratórios e metabólicos, 334
manutenção, 332
pulmões, trocas gasosas, 335–337
relevância clínica, 332
sistemas-tampão, 332–333, 335
Equivalentes Metabólicos da Tarefa (MET), 94, 294
eritrócitos (glóbulos vermelhos), 32f
como células incompletas, 31
e ferro, 137
equilíbrio acidobásico, 332
formação, 32f
funções, 142
hemoglobina, 43 *See also* hemoglobina (Hb)
metabolismo anaeróbico da glicose, 142–152
na anemia falciforme, 51
óxido nítrico, interação com a hemoglobina, 48–49
processamento do monóxido de carbono, 337
regulação da glicólise, 148–149
transporte de oxigênio, 338f
utilização de glicose, 143q
via das pentoses fosfato, função, 152
escorbuto, 12q, 71, 134–135
esfingolipídios, 27, 372–374
esfingolipidoses, 372q
esfingomielina, 373

esfingosina, estrutura e biossíntese, 373
esôfago, 115
espécies reativas de nitrogênio (ERNs), 488
espécies reativas de oxigênio (EROs), 486, 487f, 495
 defesas enzimáticas, 492f
 e estresse oxidativo, 487
 efeitos benéficos, 493
 estrutura, 487f
 formação, 488f
 produção e liberação durante a fagocitose, 494f
espectrina, 29q
espectrometria de massa
 espectrômetro de massa em *tandem*, 480
 métodos de quantificação livre de marcação, 480–481
 proteínas identificadas, 18, 479–481
 quantitativa, 480–482
espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN), 12, 19, 38, 483q
espironolactona, 313
esqualeno, 203
esquizofrenia, 568–569
estado de imunodeficiência, 511q
estatinas, 207, 208q, 234
esteatorreia, 124q
esteatose, fígado, 400f *See also* fígado gordo
esteatose hepática, 303q
estereoquímica, aminoácidos, 5
ésteres, armazenamento de ácidos graxos, 264
esteroides, 24 *See also* hormônios esteroides
esteroides urinários
 metabólitos, alteração no padrão, 212q
 separação, espectrometria de massa, 213f
esteroidogênese, 210
esteróis vegetais, 204
estilo de vida e obesidade, 198q
estímulo hipóxico, 336q
estômago
 bomba de prótons, 90, 91q
 digestão proteica, 123
 eletrólitos secretados, 111–115
 função digestiva, 115q
estresse

hiperglicemia induzida, 277q
metabolismo, 275–277
estresse oxidativo
biomarcadores, 598q
espécies reativas de oxigênio, 487
estrogênios, 212
estrutura de anel de piranose, 22
estrutura em anel da furanose, 22
estruturas neurogliais, 566–567
estudos de associação genômica ampla (GWAS), 471
estudos de transcriptômica, 466, 475
estudos do proteoma, 466
estudos metabolômicos, 466
eucariotos
biomembranas, estrutura, 27
ciclo celular, 422–424
replicação de DNA, 424
síntese proteica em células eucarióticas, 433f
transportadores ativos em células eucarióticas, 87t
exercício, aeróbico, 262
exercício, físico
e biogênese mitocondrial, 98q
efeito no músculo, 259
gasto energético, 294
éxons, 473

F

FAD (flavina adenina dinucleotídio), 2, 98
 grupos prostéticos, 100–101
fagocitose, 27, 494f, 499
falha cardíaca, 544q
falha gonadal, 528–530
falha hepática, 402
família de genes de inibidores da apoptose (IAP), 583
família de genes *Becl-2*, 583
farmacogenômica, 401
fármacos antitumorais, 133
fármacos hipoglicêmicos, 288
fator ativador de plaquetas (PAF), 27q
fator de acoplamento ATPases (F-ATPases), 86
fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), 345
fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), 439q, 545
fator de crescimento epidérmico (EGF), sinalização do receptor, 575–578
fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), 533
fator de necrose tumoral (TNF), 497
fatores de crescimento
 aterogênese, 229f
 estimulação da sinalização mTOR, 578f *See also* citocinas
 mitogênese, 579–580
 regulação da proliferação e crescimento celulares, 574–575
fatores de transcrição
 expressão gênica, 456–457
 indução gênica, 270
 regulada por esteróis, 207f
fatores de transcrição regulados por esteróis, 207f
fatores estimuladores de colônias, 497
fatores genéticos
 aterosclerose, 230q
 diabetes tipo 1, 278
 diabetes tipo 2, 279
 dislipidemias, 223t, 225q
 doenças do metabolismo de aminoácidos, 247–249
 farmacogenômica, 401
 hemocromatose, 405
 hiperamonemia hereditária, 243q

intolerância à frutose, 360q
mutações no gene da fibrilina, 384q
tempo de vida aumentado, modelos genéticos, 599
fator relaxante derivado do endotélio (EDRF), 48–49, 71, 227
fator tissular, 75–77
fator XIII, 77
fenilalanina, 7f, 60
degradação, 248f
fenilalquilamina, 89q
fenilcetonúria (PKU), 247–248
feocromocitoma, 558q
fermentação, glicólise, 147–148
Ferramenta de Rastreio Universal da Desnutrição (MUST), 300, 301f
ferritina, 33
ferro
conteúdo dos eritrócitos, 137
deficiência, 137
e oxigênio, 137
e regulação da tradução do mRNA, 463f
estado, 463q
importância, 137
metabolismo, 138f
no grupo heme, 42f
plasma, transportado, 137
sobrecarga, 487q
transporte, 137
fezes
excreção de cálcio, 348
excreção de colesterol, 208
fibratos (derivados do ácido fíbrico), 234
fibrilação auricular, 77
fibrilina, mutações gênicas, 384q
fibrina
conversão a partir do fibrinogênio, 68, 77
lise, importância, 70
fibrinogênio, 31, 73q
fibrina derivada, 68, 77
fibrinólise, 68, 76f, 79–80
fibronectina, 385–386
fíbrose cística (FC), 88, 114q *See also* regulador de condutância transmembrana da fibrose cística (CFTR)
fígado

ácidos biliares e metabolismo do colesterol, 398
álcool, metabolismo, 399–400
armazenamento de carboidratos, 154
armazenamento de vitamina A, 126
atuação da epinefrina, 269
atuação do glucagon, 269
capacidade de reserva metabólica, 393
captação de glicose, 394
cetogênese, como via metabólica exclusiva, 186–188
distúrbios *See* distúrbios hepáticos
e a lançadeira do malato-aspartato, 101
e metabolismo de carboidratos, 393–394
e metabolismo proteico, 395
estrutura, 393
farmacogenômica, 401
fígado gordo (esteatose hepática), 303q, 400f
gliconeogênese, 154
insulina, efeitos metabólicos, 268
metabolismo da bilirrubina, 396–397
metabolismo da frutose, 358
metabolismo de fármacos, 398–401
na doença de Wilson, 34q
papel no metabolismo, 393–405
proteoglicanos, 389
receptores X, 206, 208 *See also* ácidos biliares
remoção de colesterol, 207
síntese de proteínas, 395
síntese de triglicerídios, 197
síntese do grupo heme, 396
testes de função, 395
via da glicogênese, 155–156
filtração em gel (peneiramento molecular), 15
filtrado glomerular, 310–311
flavina adenina dinucleotídio (FAD), 2, 98
grupos prostéticos, 100–101
flavina mononucleotídio (FMN), 98
grupos prostéticos, 100–101
fluido extracelular (ECF), 329
fluido intersticial, e plasma, 324f
fluidos corporais, 325q
fluoreto, 136, 147q

fluoroacetato, toxicidade, 175f, 176q
fluorocitosina, 415q
fluorodesoxiuridilato (FdUMP), 415q
fluorofosfatos, 64q
fluxo de carbono, 237q
focalização isoelétrica (IEF), 16
folha β-pregueada, 11
fome, 291
formaldeído, 22
fosfatase alcalina (FA), 402
fosfatidilcolina, 26, 370f, 372f, 547–548
 formação pela via da CDP-colina, 370f
 formação por ativação do ácido fosfatídico, 371f
fosfatidiletanolamina, 26–27, 547–548
fosfatidilglicerol, 371f
fosfatidilinositol 4, 5-bifosfato, 545, 546f
fosfatidilserina, 27
fosfatos, 135–136
 como tampões intracelulares, 335
 de alta energia, 98
 frutose-6-fosfato, 143–144
 glicose-6-fosfato, 143
 processamento renal, 315
 via das pentoses-fosfato, 150–152
fosfodiesterases, 543
fosfoenolpiruvato carboxicinase (PEPCK), 165
fosfofrutocinase, 270f, 358
fosfofrutocinase-1 (PFK-1), 148–149
fosfoglicerato cinase (PGK), 145
fosfolipases, 547f, 548
fosfolipídios, 26–27, 378
 camada fosfolipídica, 82
 função surfactante, 372q
 turnover, 372
 vias de interconversão, 371f
fosforilação
 como modificação pós-traducional, 477
 em nível de substrato, 145–147
 homeostasia da glicose e metabolismo de combustíveis, 270, 271f
 oxidativa, regulação, 109–110
fosforilação em nível de substrato, 145–147

síntese de trifosfato de adenosina, 145
fosforilação oxidativa, 2
mecanismo, 97f
modificação covalente, regulação, 109
regulação, 109–110
fosforilase, 156
fracionamento com sulfato de amônio (*salting-out*), 14
frutocinase, 358
frutose, 22f, 24q
conversão em glicose, 168
digestão, 120
intolerância, hereditária, 360q
metabolismo, 358
representações lineares e cíclicas, 23f
frutose-6-fosfato, 143–144
fucose, formação, 355
fumarase, 178
função renal
avaliação, 260q, 316–318
comprometimento, 318q
funções especializadas, tecidos, 2
furosemida, 313

G

galactose, 21, 22f, 24q
conversão em glicose, 168
digestão, 120
formação, 357
metabolismo, 357–358
galactosemia, 24q, 360q
galactosilceramida (GalCer), 374
gânglios da raiz dorsal, 564
gangliosídios
estrutura e nomenclatura, 374
receptor para a toxina da cólera, 378q
turnover do gangliosídio GM1 em células humanas, 375f
gangliosidoses, 372q
gasometria, 334f, 335
gene
expressão gênica
abordagens alternativas à regulação gênica em humanos, 460–464

acentuadores (enhancers), 456
ativação preferencial de um alelo de um gene, 464
definição de gene, definição, 457q
e estrutura gênica, 473–474
eficiência e especificidade, 455, 456f
elementos de resposta, 456
genes bialélicos, 464t
genes codificantes de proteínas, em humanos, 472
interações gênicas, 466
mecanismos, 453–457
metabolômica, 38, 483–484
modificações pós-traducionais, 466
motivo dedo de zinco, 458–459 *See also* DNA (ácido desoxirribonucleico) transcrição gênica genômica proteômica RNA (ácido ribonucleico)
mutações, 51, 384q, 469–471, 590q
processos, 453
promotores, 454–456
acesso de promotores, 460
alternativos, 455
padrões de metilação de promotores, mapeamento, 471
receptores de esteroides, 457–460
regulação, 453–465
epigenética, 461q
por glicocorticoides, 458f
por metilação do DNA, 460–461
requisitos e opções no controle, 454t
TATA box, 455q
transcriptômica, 472
terapia gênica, 544q
gene APOB, edição de RNA, 462f
genes bialélicos, 464t
genitália ambígua, 212q
genoma, 2
e DNA, 420
p53 como guardiã, 581, 589
Projeto Genoma Humano, 467q
proporção de genes, 57q
proteínas desacopladoras, 106
genoma humano *See* genoma
genômica, 467–476
alterações epigenéticas, como traços hereditários, 471

análise cromossômica por microarranjos, 468
cariotipagem, 467–468
distúrbios hepáticos, 404–405
estrutura gênica e expressão gênica, 473–474
estudo da transcrição gênica por (micro)arranjos gênicos e sequenciamento de RNA, 474–475 *ver também* expressão gênica *See also* mutações, gene
expressão gênica e transcriptômica, 472
hibridização genômica comparativa, 468
hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), 469
imprinting genômico, 438q
imunoprecipitação da cromatina combinada com tecnologia de microarranjos, 476–477
polimorfismos de nucleotídios únicos, 471
reação em cadeia da polimerase, 469f
sequenciamento de DNA, 470f, 471
técnica *Chip-on-chip*, 476–477
genótipo, 295
"gerador de pulsos" do GnRH, 524q
GFR estimada (eGFR), 317
glândula pituitária
distúrbios de secreção de esteroides, 531
eixo hipotálamo-pituitária- adrenal, 523–527
eixo hipotálamo-pituitária- gonadal, 527–529, 531
eixo hipotálamo-pituitária- tireoide, 520–523
eixos de órgãos-alvo reguladores, 518t
eixos hormonais do sistema regulador hipotálamo-pituitária anterior, 519
posterior, 520
sistema regulador hipotálamo-pituitária, 519–520
tumores, 533–534
glândula pituitária anterior, 519
glândula pituitária posterior, 519
glândulas salivares, eletrólitos secretados, 111–115
glândula tireoide
distúrbios clínicos da função, 523
glicanas, 23q
gliceraldeído, 21, 358
gliceraldeído-3-fosfato, 152
gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), 145, 146f
glicerofosfolipídios
síntese, 369, 370f
via de remodelação, 371
via *de novo*, 369–371

glicerol, 24–26
ácidos graxos armazenados como ésteres, 264
gliconeogênese, 165–167, 273–274
glicerol-3-fosfato, 101
glicina, 11q, 556
glicocinase (GK), 57f, 58q, 155
glicoconjugados, 2, 22
glicocorticoides, regulação da expressão gênica, 458f
glicogênese
comparação com a glicogenólise, 160
regulação, 163
regulação hormonal, 157–158
via a partir da glicose sanguínea no fígado, 155–156
via no fígado, 156
glicogênio
digestão, 116–118
doença de Von Gierke, deficiência de glicose-6-fosfatase, 157q
doenças de armazenamento, principais classes, 160t
estrutura, 154–155
glicose, 264
hepático, mobilização pela epinefrina, 160
níveis nos músculos, dependência da histamina, 259
síntese, 2
glicogênio sintase, inibição máxima, 163q
glicogenólise, 2
comparada com a glicogênese, 160
comparada com a gliconeogênese, 164–168
no fígado, 161f
no músculo, 162–163
glicolipídios, 22, 374
como sítios de ligação para bactérias/toxinas bacterianas, 377q
defeitos da degradação, 375
glicólise
características das enzimas reguladoras, 149
e cárie dentária, 148f
e fosfofrutocinase, 270f
em células tumorais, 149q
e metabolismo, 2
em leveduras, 148f
estágio de divisão, 144
estágio de investimento, 143, 145f

estágio de rendimento, 145, 146f
fermentação, 147–148
interações com outras vias metabólicas, 144f
processo, 143
regulação nos eritrócitos, 148–149
glicômetros, 65
gliconeogênese, 2
a partir de aminoácidos e glicerol, 165
a partir do lactato, 165
conversão de frutose e galactose em glicose, 168
e a fosfofrutocinase, 270f
glicogenólise comparada, 164–168
mobilização de lipídios no decurso, 188
no jejum e na inanição, 186
regulação, 167–168
renal, 311
via, 166f
gliconeogênese renal, 311
glicoproteínas, 22, 353–367
biossíntese, inibidores, 365q
cadeias de oligossacarídios, funções, 363–367
carboidratos, função, 354t
e açúcares da dieta, 357–358
estruturas gerais, 355–356
interações célula-célula dependentes de carboidratos, 361q
modelo generalizado, 354f
mucina, relações estrutura-função, 356
síntese, deficiências, 366q *See also* carboidratos carboidratos complexos
glicosaminoglicanos (GAGs), 79
glicose, 21
aminoácidos convertidos, 264
armazenamento, 264
e transporte, 197
ciclização, 22
compostos não carboidratos, síntese a partir, 264
digestão, 120
dosagem enzimática, 65–66
ensaio para açúcares redutores, 24q
família de transportadores GLUT, 84–85
fontes, 155f
fornecimento contínuo de salvaguarda, 264

frutose convertida, 168
galactose convertida, 168
glicogênio, armazenado, 264
glicólise, 143
controle hormonal, 266f
papel do rim, 311–312
incapaz de ser sintetizada a partir de ácidos graxos, 167
insulina estimulando o transporte, 268
lactato, conversão, 143f
metabolismo anaeróbico, no eritrócito, 142–152
modificação de proteínas, 282f
Na^+/K^+-ATPase, papel na captação, 88–90
no fígado, 394
na célula β, 266
via da gliconeogênese, 155–156
reabsorção, 314
rendimento em ATP, 180t
representações lineares e cíclicas, 23f
sangue, transporte, 90f
transporte defeituoso através da barreira hematoencefálica, 85q
uso por células normais para produzir outros açúcares, 357
utilização no eritrócito, 143q
glicose-6-fosfato, 142, 357
deficiência, doença de armazenamento de glicogênio causada, 157q
glicose desidrogenase (GDH), 65
glicose sanguínea *See* glicose
α-glicosidases, 118q
glicosídios cardíacos, 89q
glicosilação, 477
glicosilceramida (GlcCer), 374
glicosilfosfatidilinositol (GPI)
âncoras de membrana, 372q, 373f
estrutura da âncora e ligação a proteínas, 373f
glicosúria renal familiar, 314
globinas, características, 40–44
globulina ligadora de tiroxina (TBG), 39
glucagon
AMPc como segundo mensageiro, 541
ciclo alimentação-jejum, 271
efeitos metabólicos, 269–271
fígado, atuação, 269

mecanismo de ação, 158–160
metabolismo de combustíveis, 265
regulação do metabolismo lipídico, 189f
resposta hormonal, terminação, 160t
glutamato, 12, 245, 555–556
carboxilação de resíduos, vitamina K, 129f
degradação de aminoácidos, 239f
excitotoxicidade, 555–556
receptor NMDA, 555f
transmissão glutamatérgica, 569–570
glutamato monossódico, reação, 239q
glutamina, 7, 12, 165, 239–241
glutaraldeído, 22
glutationa (GSH), 11q, 493q
metabolismo da glicose, 152
reduzida, 491
gordura ectópica, 305
gordura/peso corporal, 299
estilo de vida e obesidade, 198q
regulação de reservas, 198 *See also* gordura(s) obesidade programas para controle do peso
gordura(s)
classes de nutrientes, 297
digestão, 209
emulsificação prévia à digestão, 121
metabolismo, 398 *See also* ácidos graxos
gordura subcutânea, 305
gordura visceral, 305
gota, 411f, 414q
GPIb-IX (receptor de plaquetas), 73
GPIIb-IIIa (receptor de plaquetas), 72–73, 80
gradiente eletroquímico, 323
gradientes iônicos, 88q
gráfico de Eadie-Hofstee, 59, 61f
gráfico de Lineweaver-Burk, 59, 61f
gráficos de Gompertz, 593
grânulos secretores, 86
gravidez
como adaptação metabólica, 295
confirmação bioquímica, 533q
síndrome do fígado gorduroso agudo da gravidez (AFLP), 189q
grupo funcional aldeído, 21

grupo funcional cetona, 21
grupo prostético heme, estrutura, 41–42
guanosina difosfato-fucose (GDP-Fuc), 360
guanosina difosfato-manose (GDP-Man), 360

H

Halobacterium halobium, 29q
haptoglobina, 34q
α-hélice, 11
Helicobacter pylori, erradicação, 91q
hemácias *ver* eritrócitos (hemácias)
heme
 como um complexo de porfirina e ferro, 42f
 degradação a bilirrubina, 397f
 e vitamina B_{12}, 131
 síntese, 396
 variação em estruturas de entre os citocromos, 103f
heme-hemopexina, 34q
hemocromatose, 137q, 405
hemofilia, 64q, 76q
hemoglobina glicada (HbA1c), 285–287
hemoglobina (Hb), 40
 como proteína transportadora de oxigênio, 43–44
 como tetrâmero de quatro subunidades de globinas, 44f
 curva de saturação do oxigênio, 43f
 desoxigenada e oxigenada, ligações não covalentes, 45f
 estado relaxado (estado R), 64
 estado tenso (estado T), 64
 hemoglobinas artificiais, 48q
 interação com o óxido nítrico, 48–49
 interações com o oxigênio, 44
 livre, 34q
 modulação alostérica da afinidade para o oxigênio, 46–48
 separação da normal e anormal, 50f
 separação de variantes e mutantes, 50q
 síntese, 31
 variantes normais, 50
hemoglobinopatias
 anemia falciforme, 51
 classificação e exemplos, 45f
 diagnóstico, 50q

metemoglobinemia, 51q
mutações que originam, 51
hemoglobinúria paroxística noturna, 373q
hemólise, 34q
hemólise, enzimas hepáticas elevadas e plaquetas baixas (HELLP), 189q
hemostase
como parada de sangramento, 68
fibrina, lise, 70
requisitos, 68–70
trombina, papel, 77 *See also* trombose
visão geral dos mecanismos, 69f
heparina de baixo peso molecular (HBPM), 79
heparina/sulfato de heparano, 79–81, 387
efeito anticoagulante, 389q
heparinato, 31
heparinato de lítio, 31
hepatite
crônica, 402q
isoenzimas da lactato desidrogenase, padrões densitométricos, 56f
hepatócitos, 58q, 397–398
herpes-vírus simples (HSV), 64
hexocinase, 57f, 58q, 148, 155, 358
hexoses, estruturas, 22f
hibridização
DNA
efeito da composição em bases, 573
heteroduplexes, sonda-alvo, 573, 574f
polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLPs), 575, 576f
princípios, 573
princípios da hibridização molecular, 573
propriedades de pareamento, 573
sonda-molde, 574f
sondas de ácidos nucleicos, 573
sondas, marcação, 573
Southern blots, 574
utilidade, 573
hibridização genômica comparativa (CGH), 468
hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), 469
hidrolases, enzimas digestivas, 116
hidroxiapatita, 343
hidroxilisina, 354

hiperaldosteronismo, 328
hiperamonemia hereditária, 243q
hiperbilirrubinemia, pré-hepática, 402
hipercalcemia, 349f, 350
hipercalcemia associada à malignidade (HCM), 349
hipercolesterolemia, 208q
 familiar, 225–226
hipercolesterolemia familiar, 225q, 226q
hiperglicemia, 276–277
 induzida pelo estresse, 277q
 no diabetes melito, 276–277
hiperlipidemia familiar combinada, 225q
hiperlipidemias (dislipidemias), 222
hiperoxia, toxicidade, 488q
hiperparatireoidismo, primário, 347q
hiperplasia adrenal congênita, 212q, 526
hiperpolarização, 553
hiperprolactinemia, 534
hipersensibilidade, 27q
hipertensão, 558q
 arterial, como doença comum, 326q
 diuréticos, 315q
 e doença cardiovascular, 281
 glomerular, 311q
hipertensão arterial, 326q
hipertensão glomerular, 311q
hipertermia maligna, 257q
hipertrigliceridemia, 303q
hiperventilação, 49q, 340q
hipocalcemia, 350
hipocampo, 555
hipoglicemia, 157q, 284, 360q
hipoglicemia hiperinsulínica persistente familiar da infância (PHHI), 88q
hipotálamo, 519–521, 531
hipótese quimiostática, síntese de ATP, 103–106
hipotireoidismo, 524q
hipoxantina-guanina fosforibosil transferase (HGPRT), 408
hipoxia, hipobárico, 48
hirsutismo, 531
hirudina, 78
Hirudo medicinalis, 78

histamina, 246q, 259, 562
histidina, 8, 12, 41
história dietética, 299
HIV/AIDS, 424q
HMG-CoA redutase, 202, 206–207, 234
holoenzimas, 56
homeostasia
 água e eletrólitos, 320–331
 cálcio, 345–348
 celular *See* homeostasia celular
 glicose, 264–289
 controle hormonal, 266f
 papel do rim, 311–312
homeostasia celular, 573–589
 ciclo celular, 573–574, 577
 regulação, 578–581
 subversão, 589
 fator de crescimento epidérmico (EGF), sinalização do receptor, 575–578
 mitogênese, 579–580
 monitoramento do dano de DNA, 580–581
 morte celular, 581–590
 proteínas tirosina cinase, papel, 576q
 regulação da proliferação e crescimento celulares, 574–575 *See also* câncer
 sinalização do receptor de citocinas, 577–578
homeostasia de água e eletrólitos, 320–331
 compartimentos de água corporal, 320–323
 integração da homeostasia de água e sódio, 329–331
 osmolalidade, 323–324
 potássio, 325
 pressões oncótica e hidrostática, 324f
 redistribuição de água causada por alterações na osmolalidade, 321f
 sistema renina-angiotensina, 325–329
homocistinúria, 13q, 245q
homólogo do fosfato e da tensina (PTEN), supressor tumoral, 589–590
hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), 211, 524–526
hormônio da paratireoide (PTH), 344, 346f
hormônio do crescimento (GH), 532
hormônio foliculoestimulante (FSH), 527–528
 ações no ovário, 530
 ações nos testículos, 528
hormônio liberador da tireotrofina (TRH), 520

hormônio liberador de corticotrofina (CRH), 523
hormônio liberador de gonadotropina (GnRH), 527
hormônio liberador do hormônio do crescimento (GHRH), 531
hormônio luteinizante (LH), 527–528
 ações no ovário, 530
 ações nos testículos, 528
hormônios, 513–535
 acoplamento da liberação a estímulos relevantes, 514
 anti-insulina, 269–271
 desligar do sinal, 515
 e a Na^+/K^+-ATPase (bomba de sódio-potássio), 322f
 esteroides, 209–212
 ações em homens, 528
 ações em mulheres, 530
 estruturas químicas, 513, 514t
 glicogênese hepática, regulação hormonal, 157
 hidrofóbicos, 515
 imunoensaio, 519q
 incretina, 271–272
 intervalos de referência, 604t
 lipofílicos, 515
 "livres", 515
 metabolismo, 516, 517t
 metabolismo local, 516
 polipeptídicas, 536, 538
 principais proteínas ligantes, 517t
 princípios de ação, 514–516
 processos endócrinos básicos, 514f
 receptores, 515
 regulação por retroalimentação, 515
 secreção pulsátil, 518
 semelhantes a aminas, 515
 tecidos-alvo
 exemplos de metabolismo, 517t
 metabolismo local de hormônios, 516
 terminação da resposta hormonal, 160t
 testes endócrinos provocativos comumente usados, 518t
 tipos, 513, 536–538 *See also* endocrinologia bioquímica
 transdução de sinal nos tecidos-alvo, 515
hormônios anti-insulina, efeitos metabólicos, 269–271
hormônios esteroides, 209–212

ações na mulher, 530
ações no homem, 528–530
androgênios, 211
biossíntese, 210–211, 525f
corticosteroides, 211
eliminação, 212
estrogênios, 212
estrutura e nomenclatura, 210f *See also* colesterol
mecanismo de ação, 212
membranas celulares, travessia, 536
metabolismo local, 516
receptores intracelulares, 212, 538
hormônios incretinas, 271–272
hormônios lipofílicos, 515
hormônios polipeptídicos, 536, 538
hormônios tireoidianos
ações bioquímicas, 522
biossíntese, 522f
receptores intracelulares, 538
regulação da fosforilação oxidativa, 110
síndromes de resistência, 523q
tiroxina (T_4), 521–522
transportadores, 523q
tri-iodotironina (T_3), 521–522 *See also* hormônios
hormônio tireoestimulante (TSH), 521
Human Metabolone Database, 38

I

icterícia, 402–404
adulta, 404q
causas, 403t
excesso de bilirrubina, 396
intra-hepática, 402–404
neonatal, 404
pós-hepática, 402, 404
pré-hepática (hemolítica), 402, 403f
identidade genética, mapeamento de SNP, 471
ifetroban, 72
impressão digital, metabólica, 484
imprinting, 516q
imunoglobulinas, 14, 33–36, 39

estrutura, 35f
estrutura das cadeias pesadas e leves, 34
imunoglobulina A (IgA), 35
imunoglobulina D (IgD), 35–36
imunoglobulina E (IgE), 36
imunoglobulina G (IgG), 35
imunoglobulina M (IgM), 35
monoclonal, 36
receptor antigênico das células T, 502
imunoglobulinas monoclonais, 36
imunoprecipitação de cromatina combinada com tecnologia de microarranjo, 476–477
inanição, gliconeogênese, 186
inativação do cromossomo X, 464q
índice/carga glicêmica, 296–297
índice de massa corporal (IMC), 299
Índice Internacional Normalizado (INR), 76
infarto agudo do miocárdio
diagnóstico, 261q
e aterogênese, 214–235
e trombose arterial, 71
isoenzimas da lactato desidrogenase, padrões densitométricos, 56f *See also* doença cardiovascular
lesão de isquemia/reperfusão, 489q
marcadores bioquímicos, 260–262
precoce, 226q
tratamento antitrombótico, 80q
infertilidade, 531
inflamação
células envolvidas, 497t
citocinas, 496–497
interações célula-célula dependentes de carboidratos, 361f
mediadores, 496
na aterogênese, 230
na doença intestinal, 37
resposta imune inata como resposta inflamatória, 496
ingestão adequada (AI), 305
Ingestão dietética recomendada (RDA), 305
ingestões recomendadas (RDA), 298f
inibição da lisil oxidase, 383q
inibidor da via do fator tecidual (TFPI), 79
inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1), 80
inibidores da monoamina oxidase (IMAO), 558q

inibidores da plasmina, 80
inibidores da tromboxano sintase, 72
inibidores diretos da trombina (IDTs), 77
inibidores diretos do fator Xa, 79
inibidores específicos da recaptação de serotonina (ISRS), 558
inositol, 545
 fosfatidilinositol 4, 12f, 546f
 inositol-1, 4, 5-trifosfato (IP3), 545, 546f
insuficiência cardíaca, 315q, 326q, 328, 329q
insuficiência cardíaca congestiva, 89
insuficiência renal aguda, 318q
insulina
 ação, 164f, 266–267
 ciclo alimentação-jejum, 271
 efeitos metabólicos, 268f, 269
 glucagon/outros hormônios anti-insulina, efeito metabólico, 269–271
 hormônios anti-insulina, efeitos metabólicos, 269–271
 hormônios incretinas, 271–272
 isolamento, história, 265–272
 liberação, 272
 mecanismos de ação, 164f
 metabolismo de combustíveis, 265
 molécula, 265–266, 272
 precursora, 265–272
 recombinante, 576, 579q
 resistência, 268–269, 275
 secreção, 266, 267f
 sinalização, 266–267
 defeituosa, 269
 exemplo, 539
 vias, 540f
 síntese e armazenamento de ácidos graxos, 198
 tratamento do diabetes, 287–288
integrinas, 391f, 505
interações célula-célula, 23q
 dependentes de carboidratos, 361q
interações célula-célula dependentes de carboidratos, 361q
interações célula-patógeno, 23
interferons (IFNs), 497
interleucinas (ILs), 497
intermediário carboxi-biotina, 172f

intervalo aniônico, 320–321
intervalos de referência, 603
intervenção coronariana percutânea (ICP), 80
intervenções antienvelhecimento, 600–601
intestino delgado, 115, 348
intestino grosso, produção de ácidos graxos de cadeia curta, 121q
intestinos
absorção de ferro, 137
ácidos biliares secundários sintetizados, 209 *See also* cólon trato gastrintestinal (GI) intestino grosso intestino delgado
células epiteliais, transporte de aminoácidos, 124q
função comprometida, 112
peptidases, 123
pH das secreções, 115
sistemas de transporte de eletrólitos, 114f
transporte intestinal, cotransportadores de sódio, 113
íntima, 230
íntrons, 473
iodo, 136
iodoacetamida, 62
íon cúprico, 24q
ionização e dessorção a laser assistida por matriz-tempo de voo, 18–19
ionóforos, 83q
íons, 321f
íons metálicos ativos do ponto de vista redox, sequestração ou quelação, 491
íons metálicos, proteínas de transporte plasmáticas, 33
isocitrato desidrogenase, 176–177
isoenzimas, 56f, 57q
isoleucina, 6
isomaltase, 118q
isozimas (isoenzimas), 57q
isquemia, 110, 489q

J

Janus cinases (JAKs), 578
jejum
acumulação de acetil-CoA, 187
e metabolismo, 2
gliconeogênese, 186–188
metabolismo no estado de jejum, 272, 274f
prolongado, 274–275

K

katal (unidade internacional, atividade enzimática), 55

K_m (constante de dissociação)

aumento aparente, 60–61

estimativa, 58–59

kwashiorkor, 300

L

lactato

aumento, no plasma, 287

conversão de glicose, 143f

dosagem, 173q

gliconeogênese, 165, 273–274

lactato desidrogenase (LDH)

conversão de lactato em piruvato, 165

glicólise, fase de rendimento, 147

isoenzimas, 56f, 57q

lactose

absorção, 118q

biossíntese, 359q

intolerância, 120q

lançadeira de carnitina, 182

lançadeira do malato-aspartato, 101, 193, 195f

lançadeiras de elétrons, 101, 102f

lanosterol, 203

latirismo, 383q

lectina ligante de manose (MBL), 498–500

lectinas, 365–367

leflunomida, 411–412

leptina, 292–293

lesão de reperfusão, 489q

lesão vascular

diabetes melito, 276–277

fatores de coagulação, ativante, 68

formação do tampão de plaquetas-fibrina, 71

leucemia mieloide aguda, 72

leucina, 6, 245

leucócitos, 32

levedura, glicólise anaeróbica, 148f

lidocaína, 89q

ligações dissulfeto, 8, 13

limite de Hayflick, envelhecimento, 592
linfócitos
 dos tipos T e B, 501, 507
 na resposta imune adaptativa, 500
 nucleotídios, 412q
linfonodos, 504
lipase, pancreática, 121
lipídios, 2
 ácidos graxos, 24, 25t
 anormalidades, no alcoolismo, 197q
 avaliação do risco cardiovascular, 232–233
 biomembranas, estrutura, 27–29
 complexos, 369–377
 digestão e absorção, 121, 122f
 esfingolipídios, 372–374
 estrutura, 26f
 fosfolipídios, 26–27, 371f, 372
 glicerofosfolipídios, síntese e *turnover*, 369–372
 membrana, estruturas dos doadores de metila e sulfato envolvidos, 371f
 metabolismo oxidativo, 182–190
 mobilização durante a gliconeogênese, 188
 proteínas, ligadas, 21
 quilomícrons, transportados, 219
 tamanho, 21
 triglicerídios, 24–26
 via de peroxidação, 487f, 489f
lipoamida, 173
lipocalina associada à gelatinase neutrofílica (NGAL), 317
lipogênese, 2
lipólise, 2
lipoproteína de alta densidade (HDL), 221–222
 concentração diminuída, 226
lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), 197, 219–220, 224
lipoproteínas, 214–218
 apolipoproteínas, 215–218
 classes, 215t
 partículas, 215f
 receptores, 218
 separação por ultracentrifugação, 215q
lipotoxicidade, 269
líquido cerebroespinal (LCE)

células circulantes, 565
fontes, 564–565
líquido intracelular (LIC), 321f
lisil endopeptidase, 18
lisina, 12
lisina hidroxilase, 354
lisossomos, 86, 364, 366f
lúpus eritematoso sistêmico (LES), 508

M

má absorção, 111
de gorduras, 127q
de proteínas, abordagens diagnósticas, 124q
macroangiopatia diabética, 277–278
macrófagos
na explosão respiratória, 494q
na resposta imune inata, 498–500
no metabolismo de lipoproteínas e na aterogênese, 230
reconhecimento, 27
má digestão, 111
magnésio, 98q, 135–136
malato desidrogenase, 178
malonil-CoA, 191–192
malonil transacilase, 192–193
manganês, 140
manose, 21, 22f
formação, 357
manteiga *versus* margarina, benefícios para a saúde, 26q
marasmo, 300
marcação SILAC, espectrometria de massa quantitativa, 482f
marcador de afinidade codificado por isótopos (ICAT), 481
mastigação, 115
matriz extracelular (MEC), 380–390
colágenos, 380–384
comunicação de células, 389–390
e engenharia de tecidos, 391q
formação de ligações cruzadas, 384f
inibição da lisil oxidase, 383q
latirismo, 383q
proteínas não colágenas, 384–386
proteoglicanos, 386–387, 389

remodelação da matriz, 391q
síntese e modificações pós-traducionais, 382–383
matriz óssea, 343
mecanismo da visão, 571–572
medições da ureia sérica, 239q, 317
medula adrenal, 557–558
medula óssea, 32, 504
megacariócitos, 32
membrana mitocondrial externa (MME), 97
membrana mitocondrial interna (MMI), 97, 102f
membranas, biológicas, 1, 82–92
bombas de íons, 86
canais e poros, transporte, 85–86
"controle" por voltagem ou ligantes, 85 *See also* células
difusão através da bicamada fosfolipídica, 82
difusão, cinética de transporte, 84f
e cistinose, 84q
e colesterol, 200–201
especificidade dos sistemas de transporte, 84
estrutura, 27–29
e suco gástrico, acidificação, 90
exemplos de sistemas de transporte e acoplamento, 87–91
fluidez, 201
fluxo de íons, alterações, 552–553
fosfolipídios, 27
geração de potencial transmembranar e gradientes de concentração iônica, 322f
gradientes de sódio e potássio, 321
gradientes iônicos, 88q
ionóforos, 83q
mediação do transporte por proteínas de membrana, 83–84
modelo do mosaico fluido, 21, 27–29
movimento de solutos, 82f
músculo, despolarização, 255–257
Na^+/K^+-ATPase, papel na captação de glicose, 88–90
permeabilidade, 83q
perturbação por compostos anfipáticos, 29q
processos de transporte, 82–83, 91
receptores *See* receptores de membrana
reciclagem de componentes, 567
saturabilidade dos sistemas de transporte, 84
transportadores de cassette ligante do ATP (ABC), 86, 88q

transportadores musculares, fármacos inibidores, 89q
transporte ativo, 86–87
transporte e mobilização de Ca2+ no músculo, 87–88
memória imunológica, 505
meninges, 565
2-mercaptoetanol, 8
metabolismo, 2
ácidos produzidos no decurso, 332
ácido úrico, 408–411
aminoácidos
doenças hereditárias, 247–249
esqueletos carbonados, 244–245
e vias metabólicas centrais, 245f
relações metabólicas, 237f
amônia, balanço, 240f
bilirrubina, 396–397
cálcio, distúrbios, 349–350
carboidratos *See* metabolismo de carboidratos
ciclo alimentação-jejum, 272
ciclo de vida e adaptação metabólica, 295–296
colesterol, 398
combustível *See* metabolismo de combustíveis
constantes de equilíbrio das reações, 95
dislipidemia familiar, 224f
durante o estresse, 275, 277f
e piruvato, 172f
estado alimentado, 272, 273f
estado de jejum, 2, 272, 274f
exercício e biogênese mitocondrial, 98q
ferro, 138f
fígado, papel, 393–405
fosforilação oxidativa, regulação, 2, 109–110
frutose, 358
galactose, 357–358
hormônios, 516, 517t
insulina, 268–269
lipoproteína *See* metabolismo de lipoproteínas
metabolismo anaeróbico da glicose no eritrócito, 142–152
músculo, 257–260
no diabetes melito, 279–281
osso, e homeostasia do cálcio, 343–351

oxidação como fonte de energia, 94–95
oxidação de combustíveis, fases, 95
oxidativo e bioenergética, 94–110
processos químicos, 2
proteína *See* metabolismo de proteínas
purinas, 407–411
reações de hidrólise, termodinâmica, 96t
rim, papel, 311
taxa metabólica basal (BMR), 94
trifosfato de adenosina *See* trifosfato de adenosina (ATP) síntese de trifosfato de adenosina
vias metabólicas dos nucleosídios de açúcar, 359–362
vias metabólicas, regulação alostérica de enzimas limitadoras da velocidade, 63
vitamina D, 348f, 350 *See also* trifosfato de adenosina (ATP) energia
metabolismo anaeróbico da glicose, em eritrócitos, 142–152
glicólise, 143–149
síntese de 2, 3-bifosfoglicerato, 3f, 149
metabolismo da amônia, 240f
metabolismo de carboidratos
controle de receptores ativados por proliferadores de peroxissomos, 221q
e o fígado, 393–394
síntese de trifosfato de adenosina, 97
metabolismo de combustíveis
avaliação laboratorial, 284–287
glucagon, 265
insulina, 265
processamento de combustíveis, 264
metabolismo de fármacos, 398–401
hepatotoxicidade de fármacos, 399
metabolismo de lipoproteínas, 214–235
anormalidades, 224f
avaliação do risco cardiovascular, 232–235
dislipidemias, 222, 223t, 225q
enzimas e proteínas de transferência, 219
receptores ativados por proliferadores de peroxissomos, 221q *See also* lipoproteínas
via de transporte de combustíveis, 219, 224
via do excesso de fluxo, 220, 224f
vias, 219
metabolismo de nucleotídios *de novo*, 415
metabolismo de proteínas
ciclo da ureia e amônia, 395

e fígado, 395
proteínas da dieta e endógenas, 236–237
sistema ubiquitina- proteossoma, degradação proteica, 395
metabolismo oxidativo
ácidos graxos
ativação para o transporte para dentro da mitocôndria, 182
catabolismo peroxissomal, 184–185
oxidação, 183–185
vias de oxidação alternativas, 185
β-oxidação e acidúria dicarboxílica, 186q
cetogênese, como via metabólica única para o fígado, 186–188
defeitos na β-oxidação, 186q
dos lipídios no fígado e no músculo, 182–190
e bioenergética, 94–110
inibidores, 107–108
palmitato, β-oxidação, 184f
β-oxidação mitocondrial, 183–184
metabolômica, 2, 38, 63, 483–484
análise de dados e interpretação pela bioinformática e pela biologia sistêmica, 484
biomarcadores, 484
metabonômica, 483
metemoglobinemia, 51q
metformina, 289
metionina
função de sentinela, 487f
oxidação e enfisema, 491q
método de terminação da cadeia de Sanger, sequenciamento de DNA, 470f
metotrexato, 415q
miastenia grave, 561q
mielodisplasia, 72
mieloma múltiplo, 37q, 451q
minerais, 135–137 *See also* oligoelementos vitaminas
mioglobina (Mb), 40, 42–43
miosina, 252, 254f, 258t
mitocôndria
ativação de ácidos graxos para o transporte para o interior, 182
biogênese, e exercício, 98q
ciclo do ácido tricarboxílico, 172
DNA, danos, 599q
envelhecimento, teorias mitocondriais, 597–598
fosforilação oxidativa, 2, 94–110

membrana mitocondrial interna, 102f
β-oxidação mitocondrial, 183–184
síntese de ATP, 97–98
sistema de transporte de elétrons, 98–101
transferência de elétrons de NADH, 101–103
mitogênese, 579–580
mitose, 573–574
modelo concertado, cooperatividade, 64
modelo do mosaico fluido das membranas biológicas, 21, 27–29
modelo dos filamentos deslizantes, contração muscular, 255, 256f
molécula de gramicidina A, 83
moléculas
de adesão, 505
de reconhecimento de antígenos, 501–502
mudanças químicas dependentes da idade, 594t
moléculas de adesão, 505
moléculas de adesão da família de supergenes das imunoglobulinas, 505
molibdênio, 140
monitorização de reações múltiplas (MRM), 480
monitorização de reações selecionadas (SRM), 480
monócitos, 229, 498
monofosfato de adenosina (AMP), 162–163
monofosfato de inosina (IMP)
conversão em AMP e GMP, 410f
síntese, 407–410
monofosfato de orotidina (OMP), 411–412
monofosfato de uridina (UMP), 411
monossacarídios
clivagem hidrolítica, 116–118
digestão, 116–118, 120
mecanismos de transporte mediados por transportador, 120
monóxido de carbono (CO), 107–108
envenenamento, oxigenoterapia hiperbárica, 43q
morte celular, 581–590
apoptose, 582–584
autofagia, 583–586
câncer, 585–587
caspases, 583
homólogo do fosfato e da tensina, 589–590
p53 como guardião do genoma, 589
vias de morte intrínseca e extrínseca, 584q

morte celular programada (PCD), 581
motivo dedo de zinco, expressão gênica, 457–459
mRNA (ácido ribonucleico mensageiro) *See* ácido ribonucleico mensageiro (mRNA)
mTOR (alvo da rapamicina em mamíferos), 588q
mTORC 1 e 2 (complexos de sinalização), 577
músculo, 251–263
 ação da epinefrina, 269
 acoplamento excitação-contração, 255–257
 ATP, na contração muscular, 257–258
 células estriadas, 259
 contração; *ver* contrações muculares
 desempenho a longo prazo, 259
 despolarização da membrana, 255–257
 esquelético, 253t, 256f
 estrutura, 251–254
 estrutura hierárquica, 253f
 exercício, efeito, 259
 fibras rápidas glicolíticas e lentas oxidativas, 259
 filamentos grossos e finos, 251
 glicogenólise, 162–163
 liso, 257
 metabolismo energético, 257–260
 proteína cinase A, regulação, 162f
 sarcômero, 251–254
 síndromes consumptivas, 260q
 substituição, e engenharia de tecidos, 260–261
 transportadores, fármacos inibidores, 89q
músculo cardíaco, 256–257
mutações, gene
 estudo, 469–471
 hemoglobinopatias, 51
 no desenvolvimento de câncer, 585–587
mutagênicos, teste de Ames, 427q

N

N-acetil benzoquinoneimina (NABQI), 399
N-acetil cisteína (NAC), 399
NAD+ (nicotinamida adenina dinucleotídio), 2, 130
NADH (nicotinamida adenina dinucleotídio reduzida), 101–103
NADP+ (nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato), 130
NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato, reduzida), síntese, 150
Na^+/K^+-ATPase (adenosina trifosfatase de sódio-potássio; bomba de sódio-potássio)
 compartimentos de água corporal, 321f, 322f
 estrutura, 323f
 função catalítica, 322f
 geração de gradientes de concentração iônicos, 321, 322f
 papel na absorção de glicose, 88–90
 regulação por hormônios, 113, 322
Necessidade Média Estimada (EAR), 305
necrose, 581
nefrônio, como unidade funcional, 309
nefropatia diabética, 311q
neonatos
 deficiência de cobre, 103q
 distúrbios do metabolismo dos aminoácidos, rastreio, 244q
 doença hemorrágica do recém-nascido, 129
 epilepsia, 562q
 icterícia, 404
neoplasia, 518–519
neoplasia endócrina múltipla do tipo IIA (MEN IIA), 461
nervo periférico, e cérebro, 564–565
neuromoduladores, 563
neurônios
 características, 566
 gradientes de íons, 570
 íons cálcio, atividade neuronal, 570
 neurotransmissão, 566
 sinapses, 567
 transporte axonal, 566
neuropatia diabética, 283
neuropeptídios, 563
neuroquímica, 564–572
 cérebro e nervos periféricos, 564–565

mecanismo da visão, 571–572
neurônios, 566, 567f
transmissão sináptica, 567–571
neurotransmissores, 551–563
acetilcolina, 560–561
ácido γ-aminobutírico (GABA), 556
amina, 558q
catecolaminas, 556–557
classes, 555–563
classificação, 551, 552t
concentrações, 555
deficiência do neurotransmissor central, 559q
despolarização, 553
dopamina *See* dopamina
e baixo peso molecular, 552t
epinefrina *See* epinefrina
gás de óxido nítrico, 561
glicina, 556
hiperpolarização, 553
liberação, 553f
mecanismo de ação, 554f
mudanças no potencial de membrana, 553
nas sinapses, 553
neurotransmissão, 552–555
norepinefrina, 557f, 558
peptídios, 562–563
pequenas moléculas, 562
potenciais de ação, 552–553
receptores, 554
receptores ionotrópicos, 554
receptores metabotrópicos, 554
receptor NMDA, 555f
regulação, 554–555
remoção da fenda sináptica, 554
serotonina, 560
síntese, 556f
sistema límbico, 555f
neurotransmissores amina, depressão como doença, 558q
neutrófilos, 498–499
N-glicanos
estrutura dependente no complemento enzimático da célula, 357q

início de montagem no retículo endoplasmático, 362
papel no enovelamento das proteínas, 363
niacina (vitamina B3), 41–42, 130–131
níquel, 140
nitrogênio
conceito de balanço, 244
excreção, 241t
excreção urinária, 299
fluxo, 237q
fontes de átomos na síntese de ureia, 240f
incorporação na ureia, 239
na ureia sanguínea, dosagem, 239q
remoção, 395
nível de ingestão máxima tolerável (UL), 305
norepinefrina, 314f, 569
neurotransmissores, 557f, 559q
nucleossomos, 421
nucleotídios, 407–416
classificação, 408f
desoxinucleosídios, formação, 413–415
em linfócitos, 412q
formação, 407
função e especificidade das sequências, 455q
marcação de sondas, 573
pirimidinas *ver* pirimidinas
polimorfismos de nucleotídios únicos, 471
purinas *ver* purinas
reduzidos, 99f
reparo por excisão, 425
vias de reciclagem, 408, 410f, 412q, 413
nucleotídios de adenina, estruturas, 96f
nucleotídios de pirimidina
catabolismo, 415
e purinas, 407
metabolismo, 411–413
nomes e estruturas, 408t
síntese, 412f
via *de novo*, 411–413
vias de reciclagem, 413 *See also* nucleotídios
nucleotídios purínicos

e pirimidínicos, 407 *See also* nucleotídios
metabolismo, 407–411
nomes e estruturas, 408t
nucleotídios de purina pré-formados, reciclados pelas vias de reciclagem, 408, 410f
síntese *de novo* do anel purínico, 407–408
nutrição, 291–307
ácidos graxos essenciais, 196
alterações durante o ciclo de vida, 296
avaliação do estado nutricional, 298–300
ciclo de vida e adaptação metabólica, 295–296
classes de nutrientes, 296–297
conteúdo energético do alimento, 94, 95t
definições, 298, 305q
desnutrição, 300–303
equilíbrio energético, regulação, 292–294
fatores determinantes do estado, 291f
frutas e vegetais como melhores fontes de vitaminas, 135
marcadores bioquímicos do estado nutricional, 299–300
nutrientes essenciais (limitantes), 298
nutrigenômica, 294–296
proteína enzimática, alteração na quantidade, 193
regulação da ingestão de alimentos, 291–292, 295t
sistema canabinoide endógeno, 292
suporte nutricional, 302t, 303
nutrição enteral, 302
nutrição parenteral total, 303

O

obesidade, 198q, 302–304
e doença cardiovascular, 281
no diabetes tipo 2, 278–279, 303
tratamento cirúrgico, 304
O-glicanas, 363
oligodendrócitos, no sistema nervoso central, 567
oligoelementos, 2, 126, 137–140, 300
oligomicina, 108
inibição, 109f
oligossacarídios, 22
biossíntese, 362–363
cadeias oligossacarídeas das glicoproteínas, funções, 363–367
complexos N-ligados, 364f

das mucinas no complexo de Golgi, biossíntese da *O*-ligação, 365f
ricos em manose e complexos, N-ligados, 355, 364, 375, 448–449
solubilidade e estabilidade das proteínas, 365
oncogenes (promotores tumorais), 587–589
opioides, 562
Orientações das Joint British Societies (JBS2), 232
ornitina transcarbamoilase, 241q
osso
ciclo da remodelação, 344f
doença de Paget, 351
doença metabólica, 350–351
estrutura e remodelação, 343–345
metabolismo e homeostasia do cálcio, 343–351
mineralização, 343
osteoblastos, 345
osteoclastos, 344
osteogênese imperfeita, 12, 382q
osteomalacia, 128, 349q
osteoporose, 307, 350–351
ouabaína, 89q
ovários, 210, 531
excesso de secreção de esteroides, 531
oxidação
combustível, fases, 95
como fonte de energia, 94–95
oxidação de combustíveis, fases, 95
oxidação de etanol, 400
óxido nítrico
e a parede vascular, 71q
interação com hemoglobina, 48–49
neurotransmissores, 561
oxigênio, 486–495
como essencial e como tóxico, 2
danos dos radicais, 489–490
defesas antioxidantes, 490–493
espécies reativas de oxigênio, 487f
estrutura, 487f
interações da hemoglobina, 44
lei de Dalton, 40
o ferro, 137
propriedades, 40

reações de dessaturação, 196
tensão, 1
transporte, 31, 40–53, 338f
oxigenoterapia hiperbárica, envenenamento por monóxido de carbono, 43q
oximetria de pulso, 46q
oxirredutases, 56, 130
oxisteróis, 204

P

p53 (guardiã do genoma), 581, 589
palmitato, β-oxidação, 184f
pâncreas
eletrólitos secretados pelo, 111–115
função exócrina, 123q
pancreatite, 123q
pancreatografia retrógrada endoscópica (CPRE), 124
paracetamol (acetaminofeno), 399
paralisia periódica familiar, 570q
parede vascular, 230
penicilina, 33, 62q
estrutura, 62f
pepsinogênio, 115q, 123
peptidases
digestão de peptídios, 122–123
proteínas hidrolisadas, 122–123
peptidil transferase, 447q
peptídio de extensão de pró-colágeno (ICTP), 345
peptídio natriurético atrial (ANP), 329q
peptídio natriurético cerebral (BNP), 329q
peptídios
antibióticos, 83q
cadeias peptídicas
características de carga e polaridade, 11
enovelamento, 13
interações, 13 *See also* aminoácidos; proteínas
clivagem das ligações, 60, 123
digestão, 123–125
formação da ligação peptídica, 444f
neurotransmissores, 562–563
resíduos carbonila, interação com resíduos de amida na estrutura peptídica, 11
peptídios natriuréticos, 328, 329q

peristaltismo, 115
pH, 1, 55, 115
Pirâmide Alimentar, 304
piridoxal fosfato (PLP)
 deficiência, 562q
 papel catalítico, 238f
piridoxina (vitamina B_6), 131
pirofosfato de farnesil, 202, 203f
pirofosfato, fórmula estrutural, 351f
piruvato, 142, 165, 172
piruvato carboxilase (PC), 165, 172
piruvato cinase (PK), 149
 deficiência, 147q
piruvato desidrogenase cinase, 173
piruvato desidrogenase fosfatase, 173
placa aterosclerótica, 227f, 231f, 232
plaquetas, 32f
 ativação, estimulação, 71
 avaliação da função, 77
 destruição excessiva, 72
 distúrbios hemorrágicos relacionados com plaquetas, 72
 formação defeituosa, 72
 ligantes, 73q
 metabolismo de lipoproteínas e aterogênese, 231
 receptores de glicoproteínas, 72q
 receptores de membrana, 73q
 requisitos da hemostase, 68–70
plasma
 como fonte de informação, 1
 concentração de glicose, 284–285
 concentração de potássio, 325
 e fluido intersticial, 324f
 fatores de coagulação, 74
 íons, 321f
 lipídios, 24, 232–233
 proteína C-reativa, 226q
 proteínas *See* proteínas plasmáticas
 transporte de ferro, 137
plasmídio
 bacteriano, uso como vetores, 576
 formação, 578f

plasmina, 80
plasminogênio, 79
Plasmodium falciparum, 51
polimerases, DNA, 432
polimerases, RNA, 432
polímeros, da dieta, 117f
polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), 575, 576f
 anemia falciforme, 576q
polimorfismos de nucleotídio único (SNP), 471
polissacarídios, 22–23, 25f
 clivagem hidrolítica, 118f
 digestão, 116–118
polissomos, na síntese proteica, 437f
pontes dissulfeto, 477
ponto de restrição, mitogênese, 579–580
ponto isoelétrico, do pH, 10
população afro-americana, anemia falciforme, 51, 576q
porfiria aguda intermitente (AIC), 397q
porfirias, 397q
porfirina, no grupo heme, 42f
poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM), 110
potássio, 135–136, 325
 absorção e secreção no cólon, 113–115
 balanço, 288q, 326f, 328
 distribuição, 321f
 manutenção de gradientes através da membrana celular, 321 *See also* Na^+/K^+-ATPase
potencial de ação, geração, 553f
potencial máximo de expectativa de vida (MLSP), 593f
pré-calicreína, 74
pressão parcial de oxigênio (pO_2)/pressão parcial de dióxido de carbono (pCO_2), 40, 336t
pressão sanguínea, sistema renina-angiotensina no controle, 325–329
pró-carboxipeptidase, 63
procariotos, 431–432, 434f
processo contrátil, músculo, 255–257
processo de transporte uniporte/uniporte, 84–85, 87
processos de transporte antiporte, 87
processos de transporte simporte, 87
pró-colágenos, 354, 383
pró-dinorfina, 562
produtos finais da glicoxidação e lipoxidação avançada (AGE/ALEs), 596–597
pró-elastase, 63

pró-encefalina A, 562
pró-enzimas caspases efetoras, 583
progesterona, 530
Programa Nacional de Educação para o Colesterol Painel de Tratamento de Adultos III (ATPIII), Estados Unidos, 232
programas de perda de peso, 188q, 303, 304q *See also* dietas pobres em carboidratos
Projeto Genoma Humano (PGH), 467q
prolactina
 distúrbios de secreção clínicos, 534–535
 eixo da prolactina, 534–535
 macroprolactina, 534q
prolactinoma, 534–535
prolina, 8, 11
pró-opiomelanocortina, 562
propionil-CoA, 185, 186f
prostaciclina, 71
prostaglandinas, 62, 231
protease multicatalítica (MCP), 450–451
protease PCSK9, 204q
proteases
 de serina, 60
 de tirosina, 6, 565q
 pancreáticas, 123
proteassomas, 450–451
proteína ácida fibrilar glial (GFAP), 566
proteína ativadora de GTPase (GAP), 575–577
proteína banda 4.1, 29
proteína cinase A
 no armazenamento e síntese de carboidratos, 158, 162f
 regulação no músculo, 162f
 segundos mensageiros, 541–543
proteína cinase ativada por AMP (AMPK), 293, 294f
proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK), 575–577
proteína cinase C, 545
 superfamília, 547t
proteína C-reativa
 concentração no plasma, 226q
 e resposta de fase aguda, 36–37
proteína de ligação à vitamina D (DBP), 345
proteína dimérica, estrutura tridimensional, 13f
proteína morfogenética óssea (BMP), 345
proteína príon-forma celular (PrPC), 19

proteína relacionada ao paratormônio (PTHrP), 349, 350q
proteínas, 2, 20, 441–452
açúcares ligados a aminoácidos específicos, 353–355
alostéricas, 46
aminoácidos encontrados, 5, 6t
análise da estrutura, 17–19
carboidratos
interações, 365–367
ligados, 21
classes de nutrientes, 297
clonagem baseada em células, 575
código genético, 441–442
colágenos, 12q, 380
como polímeros, estrutura primária e funcional, 5
como tampões intracelulares, 335
determinação da pureza e do peso molecular, 16
diálise e ultrafiltração, 14, 15f
digestão e absorção dietéticas, 237
diméricas, estrutura tridimensional, 13f
elevada ingestão, 131
endereçamento, 448–449
endógenas, turnover, 237
enovelamento, 19q, 363–364, 446–448
e peptídios, 13
espectrometria de massa, identificação, 479–480
estratégia, purificação, 18f
estrutura primária, 10, 14f, 18–19
estrutura quaternária, 13
estrutura secundária/motivos estruturais secundários, 11, 12f, 14f
estrutura terciária, 13f, 14f
estrutura tridimensional, 19
fidelidade da tradução, 443q
filtração em gel (peneiramento molecular), 15
fracionamento, 13–16
globinas mamíferas, características, 40–44
glutationilação, 493
hidrólise, 17
ligação de hormônios, principais, 517t
má absorção, abordagens diagnósticas, 124q
metabolismo *See* metabolismo de proteínas
modificações pós-traducionais, 14q, 450

moléculas proteicas funcionais, 2
perda, edema resultante, 324q
peso molecular, determinação, 16
plasmáticas *See* proteínas plasmáticas
proteínas de ancoragem à membrana, 29q
proteínas G *See* proteínas G
pureza, determinação, 16
purificação e caracterização, 13–16, 18f
salting-out (fracionamento com sulfato de amônio), 14
sarcômero, 252–254
separação
com base na carga, 15–16
com base no tamanho, 14–15
técnicas, 478–479
sequências peptídicas sinal, 434–435
síntese *See* síntese proteica
sistema ubiquitina- proteassoma, degradação proteica, 395
turnover, 450–451
ultrafiltração, 14 *See also* aminoácidos
valores de p*Ka* para grupos ionizáveis, 9t
proteínas alostéricas/efetoras, 46, 109
proteínas de ancoragem à membrana, 29q
proteínas de Bence-Jones, 37
proteínas de ligação ao elemento regulador de esteróis (SREBP), 205–206
proteínas de transferência, e enzimas, 219
proteínas G
alvo de toxinas bacterianas, 542q
como interruptores moleculares, 540
glucagon, mecanismo de ação, 158
homeostasia do cálcio, 345
receptores de membrana acoplados, 539
receptores metabotrópicos acoplados, 554
regulação de processos biológicos, 540
sinalização, 536–539, 550
subunidades, 541t, 542q
proteínas globinas mamíferas, características, 40–44
proteínas multiméricas, 13
proteínas plasmáticas, 39
albumina, 32–33, 39
classificação, 32f

como marcadores do estado nutricional, 299
e hormônios, 515
fígado, síntese, 395
imunoglobulinas, 33–36
lipoproteínas, 214
transportando íons metálicos, 33
proteínas tirosina cinases
papel, 576q *See also* proteína cinase A proteína cinase C
proteínas transmembranares, 28
proteínas transportadoras, 33, 133q
proteínas transportadoras, 83
e hormônios livres, 515
proteínas triméricas, 13
proteoglicanos
ácido hialurônico, 387
distribuição, 387t
estrutura, 386–387
funções, 388–389
modelo generalizado, 354f
síntese e degradação, 387–388
sulfato de dermatano, 387
sulfato de heparina/heparano, 387, 389q
sulfato de queratano, 387
sulfatos de condroitina, 387
proteoma, 18f
proteômica, 2, 18q, 477–483
metodologia, 478–483
modificações pós-traducionais, 477q
técnicas de espectrometria de massa, 479–480, 482f
técnicas de separação de proteínas, 478–479
técnicas não baseadas em espectrometria de massa, 482–483
pseudoxantoma elástico, 88q
puberdade precoce, 530–531
pulmões
doença crônica, acidose respiratória, 336q
equilíbrio acidobásico, 332
perfusão, 336–337
troca gasosa, 335–337

Q

queratinização, 582

quilomícrons, 219
quimiocinas, 497
quimioterápicos antirretrovirais, 425f
quimotripsina, 55f, 60
quimotripsinogênio, 63
quiral, 5

R

radiação ultravioleta
 aminoácidos aromáticos, 7f
 e síntese de vitamina D, 345
radical hidroxila, 489–490
radioterapia, 488q
raquitismo, deficiência de vitamina D, 128
Ras GTPase, 575–577
razões P:O, 104–106
reação de fase aguda pós-cirúrgica, 37f
reação de Fenton, 488f
reação de Haber-Weiss, 488f
reação em cadeia da polimerase (PCR), 469f
reação pela aconitase, 176, 177f
reações de hidrólise, termodinâmica, 96t
reagentes alquilantes, 62
recém-nascidos *See* neonatos
receptor do fator de crescimento de fibroblastos do tipo 3, 548q
receptores β-adrenérgicos, 541, 544q
receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPARs), 221q, 272f, 288q
receptores da angiotensina, 326
receptores de lipoproteínas de baixa densidade, 220f
 degradação, 204q
 e osteoblastos, 345
 modelo, 356f
 na hipercolesterolemia familiar, 225q
 na regulação da concentração intracelular de colesterol, 221
receptores de membrana, 536–550
 acoplamento a proteínas G, 539
 acoplamento a vias de sinalização, 538
 cascatas de sinalização, 543, 544f *ver também* membranas
 classificação, 537t
 fosfodiesterases, inibidores, 543
 receptores de monoaminas, 536–538

segundos mensageiros, 541–548
sinais celulares, processamento, 536
sinalização de proteínas G, 539f
tipos de hormônios, 536–538
transdução de sinal intracelular (acoplamento de receptor), 538–540
receptores de monoaminas, 536–538
receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), 498
receptores esteroides, 457–459
família de genes, 460q
organização, 459
receptores de hormônios da tireoide, 460q
similaridade, 459f
receptores ionotrópicos (canais iônicos), 554
receptores *scavenger*, 218
receptores metabotrópicos, 554
receptores muscarínicos, 561
receptores nicotínicos, 561
receptores semelhantes ao NOD (NLR), 499–500
receptores semelhantes ao Toll (TLR), 499
ligantes e distribuição celular, 500t
receptor extracelular sensível ao cálcio (CaSR), 345
receptor RANK, 344
regiões de membrana, 29q
regulação alostérica, enzimas, 63, 65f
regulação por retroalimentação, hormônios, 515
regulador de condutância transmembrana da fibrose cística (CFTR), 88, 113 *See also* fibrose cística (FC)
resíduos amida, estrutura peptídica, 11
resíduos carbonila, interações com resíduos amida na estrutura peptídica, 11
resposta de fase aguda, 38q
acidente rodoviário, 38q
e proteína C-reativa, 36–37
resposta imune, 496–512
adaptativa, 499t, 500, 507–510
células B *See* células B
comparação de receptores antigênicos na imunidade inata e adaptativa, 499t
complexo principal de histocompatibilidade, 502–503
diversidade, 508
e células T *See* células T
inata, 496–500
ligantes e distribuição celular dos receptores semelhantes ao Toll, 500t
linfócitos, tipos T e B, 501

moléculas envolvidas no reconhecimento antigênico, 501–502
tecidos linfoides, 503–504
vacinação, 509
resposta imune adaptativa, 500
como resposta integrada, 506
distinguida de resposta inata, 505
humoral, 507–510
receptores de antígenos, 499t
resumo, 510f
resposta imune inata, 496–500
cascata do complemento, 498f
células, 498–500
distinguida da resposta adaptativa, 505
receptores de antígenos, 499t
resposta "luta ou fuga", 557
restrição calórica, e envelhecimento, 600–602
retardo de desenvolvimento, 85q
retículo endoplasmático (RE)
estresse e enovelamento proteico, 446–448
processamento intermédio, 363
síntese proteica, 449f
retículo endoplasmático rugoso (RER), 434
retinol, vitamina A convertida, 126
retinopatia diabética, 277
rianodina, 89q
riboflavina (vitamina B2), 56, 130
ribonucleotídio redutase, 413–415
ribose-5-fosfato, 152
ribossomos, 432–435
ribozimas, 436–438
ribulose-5-fosfato, 152
ricina, toxicidade, 367q
rim
comprometimento da função renal, 318q
controle neuronal da função, 311
excreção do íon hidrogênio, 339f
filtrado glomerular, 310–311
função renal, avaliação, 260q, 316–318
funções-chave, 309
hiperglicemia e estresse mecânico, 311q
hipertensão glomerular, 311q

nefrônio como unidade funcional, 309
nefropatia diabética, 311q
papel na homeostasia da glicose, 311–312
papel no equilíbrio acidobásico, 332
papel no metabolismo, 309–319
proteoglicanos, 389
sistemas de transporte membranar, 312–315
transporte de Na^+ e sistema renina-angiotensina- aldosterona, 90–91
túbulos *See* túbulos renais
rinorreia, 565q
RNA (ácido ribonucleico), 2, 418, 429–440
alça em grampo de cabelo, 430f
classes gerais, 429t
degradação seletiva ou inativação, 438–439
edição ao nível pós- transcripcional, 462
elongação, RNA mensageiro, 433–434
imprinting genômico, 438q
iniciação, mensageiro, RNA, 433
interferência, 462
marcação de sondas, 573
mensageiro, 432–435, 461
polimerases, 432
pré-rRNA e pré-tRNA, 435–436
procariotos, 431–432, 434f
processamento de pré-mRNA, 437–438
processamento pós-transcricional, 435–438
ribossomal, 429, 430t
RNAs não codificadores (NCRNAs), 473q
sequenciamento, 474–475
sondas, 573–574
splicing, 437f
terminação, RNA mensageiro, 434–435
transcrição, 432–433, 435
RNA polimerase (RNAPol), 432–435, 454
RNA ribossomal (rRNA), 429, 430t
RNAs de transferência (tRNAs), 429, 430f
rotenona, 107

S

sais biliares, 121
salicilatos, 33

saliva, 115
salting-out (fracionamento do sulfato de amônia), 14
sangramento gástrico, fármacos antiplaquetários, 72
sangue, 1, 31–39
 atividade fibrinolítica, prevenção da excessiva, 80
 coagulação, 74–79
 ativação de fatores de coagulação, 75f
 avaliação laboratorial das vias intrínseca, extrínseca e final comum, 74
 cascata de coagulação, 74
 deficiências congênitas e sangramento excessivo, 74
 ensaios de coagulação globais, 76q
 fígado e metabolismo proteico, 395
 inibidores, 78–79, 81f
 requisitos da hemostase, 68–70
 tempo de coagulação da trombina, 74, 77
 tempo de tromboplastina parcial ativada, 74–75
 via extrínseca, 68, 74
 via final comum, 74, 77
 via intrínseca, 68, 74–75
 composição do sangue, 31
 deficiência de antitrombina, 79q
 elementos formados, 31–32
 fibrinólise do sangue, 68, 79–80
 formação de coágulos, 31, 129
 oculto, detecção da atividade da peroxidase, 493q
 parede vascular, 320 *ver também* hemorragia; excessiva; *See also* proteínas plasmáticas cálcio sérico *ver também* ureia sérica dosagens
 plaquetas *See* plaquetas
 plasma *See* plasma
 resposta de fase aguda e proteína C-reativa, 36–37
 transfusão, 31
 transporte de glicose, 90f
 trombina, 77–79
sarcômero
 proteínas, 252
 unidade contrátil funcional, 251
segundos mensageiros, 538, 541–548
 calmodulina, efetores-alvo, 545–548
 cascatas de sinal, 543, 544f
 derivada da fosfolipase, 545–548
 monofosfato de adenosina 3'5'-cíclico (AMPc) fosfodiesterase, 543

proteína cinase A, 542–543
segundos mensageiros derivados da fosfolipase, 545–548
seleção clonal, antígenos, 505
selectinas, 505
selênio, 139–140, 491q
selenocisteína, 249q, 491q
senescência replicativa, 592
sepse, perda muscular durante, 255q
serina, 7, 12
serina proteases, 60
serotonina (5-hidroxitriptamina), 71, 560
sinal de localização nuclear (NLS), 457
síndrome carcinoide, 561q
síndrome coronariana aguda, tratamento antitrombótico, 80q
síndrome da angústia respiratória aguda, 372q
síndrome da secreção inapropriada de hormônio antidiurético (SIADH), 329
síndrome das pernas inquietas, 568–569
síndrome de Alport, 382
síndrome de Bartter, 316q
síndrome de Bernard-Soulier, 72
síndrome de Crigler-Najjar, 405
síndrome de Cushing, 526, 527q
síndrome de Dubin-Johnson, 88q, 405
síndrome de Ehlers-Danlos, 12q, 71
síndrome de fígado gorduroso agudo da gravidez (AFLP), 189q
síndrome de Gilbert, 405
síndrome de Gitelman, 316q
síndrome de Goodpasture, 382
síndrome de Guillain-Barré, 565q
síndrome de imunodeficiência combinada severa (SCID), 579q
síndrome de Kallmann, 530
síndrome de Klinefelter, 528–530
síndrome de Lesch-Nyhan, deficiência de HGPRT, 414q
síndrome de Marfan, 384q
síndrome de McCune-Albright, 548q
síndrome de realimentação, 300
síndrome de Rotor, 405
síndrome de Zellweger, 88q, 185
síndrome de Zollinger-Ellison, 124q
síndrome metabólica, 37, 281q
síndrome nefrótica, 37q

síndromes consumptivas, músculo, 260q
síndrome Smith-Lemli-Opitz, 210q
sintase do óxido nítrico (NOS), 488
síntese de trifosfato de adenosina
 a partir do IMP, 408
 desacopladores/proteínas desacopladoras, 106 *See also* trifosfato de adenosina (ATP)
 energia livre para, 170
 hipótese quimiostática, 103–106
 inibidores, 108
 mitocondriais, de coenzimas reduzidas, 97
 por fosforilação em nível de substrato, 145–147
 razões P:O, 104–106
síntese de ureia, 242t
síntese proteica, 2
 elongação, 445
 formação de ligações peptídicas e translocação, 444f
 iniciação, 445
 maquinaria, 442–444
 no retículo endoplasmático, 449f
 nos polissomos, 437f
 peptidil transferase, 447q
 terminação, 446, 448f
sintomas neurológicos, deficiência de piridoxina, 131
sinusoides, 393
sistema canabinoide endógeno, 292
sistema circulatório, envelhecimento, 598q
sistema complemento, 497, 509
 cascata do complemento, 498f
sistema de amplificação em cascata, armazenamento e síntese de carboidratos, 159f
sistema esquelético, 343
 músculo, 253, 256f
sistema fibrinolítico
 remoção do tampão plaquetas-fibrina, 71
 requisitos da hemostase, 68–70
sistema glioxilase, 494f
sistema límbico, 555f
sistema nervoso autônomo (SNA), 552f
sistema nervoso, células, 566–567
sistema nervoso central (SNC)
 glutamato, 555
 nervos serotoninérgicos, 560f

neurônios de norepinefrina, 557f
oligodendrócitos, 567
parênquima cerebral, 564
sistema nervoso simpático (SNS), 557
sistema regulador hipotálamo-pituitária, 519–520
sistema renina-angiotensina- aldosterona (SRAA), 91
sistema respiratório
acidose respiratória, doença pulmonar crônica, 336q
controle da frequência respiratória, 336f
controle respiratório e regulação por retroalimentação, 109
equilíbrio acidobásico, componentes respiratórios e metabólicos, 332–335
síndrome do desconforto respiratório agudo, 372q
trocas gasosas, 335–337
sistema ubiquitina-proteassoma, degradação proteica, 395
sitosterolemia, 88q
sódio, 135–136
cotransportadores, 113
distribuição, 321f
homeostasia, 328
manutenção de gradientes através da membrana celular, 321
osmolalidade, 323–324
reabsorção, 311, 313f *See also* Na^+/K^+-ATPase
transporte eletroneutro e eletrogênico, 113
somatostatina, 531–532
soro, dosagens químicas executadas, 31
SOS (fator de troca de nucleotídios de guanina), 575–577
substância P, 562
succinato, 100
succinato desidrogenase, 178
succinil-CoA, 186f
succinil-CoA sintetase, 177–178
suco gástrico, acidificação pela bomba de prótons, 90
suco pancreático, 63
6-sulfato de condroitina, 388f
sulfato de dermatano, 387
sulfato de magnésio, 43q
sulfato de queratano, 387
sulfatos de condroitina, 387
6-sulfato de condroitina, 381f
sulfonamidas, 33
sulfonilureias, 288–289

superóxido, formação, 488f

T

tabagismo, 491
β-talassemia, 50
tampões/sistemas-tampão
 aminoácidos, 10
 concentrações, 1
 equilíbrio acidobásico, 332–333, 335
 principais tampões no corpo humano, 333t
 tampões de bicarbonato, 334f
 tamponamento intracelular, 335
tamponamento intracelular, 335
taxa de filtração glomerular (TFG), 316
 estimada (eTFG), 317
taxa metabólica basal (TMB), 94, 97, 294
taxa metabólica de repouso (TMR), 94
tecido adiposo
 atividade endócrina, 296t
 citocinas, secreção, 293
 como órgão endócrino ativo, 292, 293f
 e doença, 305q
 insulina, efeitos metabólicos, 268 *See also* peso corporal gordura(s) obesidade
tecidos
 ação hormonal, 515–516
 funções especializadas, 2
 vitaminas armazenadas, 126
tecidos linfoides
 primários (centrais), 503–504
 secundários (periféricos), 504
tecidos linfoides associados às mucosas (MALT), 504
técnica de degradação de Edman, 17–18, 19f
técnica *Chip-on-chip*, 476–477
tecnologias robóticas, 38
telômeros, 421–422, 599q
tempo de coagulação da trombina (TCT), 74, 77
tempo de coagulação de caolin- cefalina (KCCT), 74
tempo de protrombina (TP), 74
tempo de tromboplastina parcialmente ativada (TPTA), 74–75
tempo de vida, 600
teor calórico, 296t

teoria do envelhecimento pelos radicais livres (FRTA), 595
terapia AZT, HIV/AIDS, 424q
terapia de substituição hormonal (TRH), 531q
terapia farmacológica
 agentes antivirais, 64q
 antibióticos, 83q, 133, 435q, 436q
 anticoagulantes, 31, 76q, 81, 389q
 antidepressivos tricíclicos (ADTs), 558q
 anti-histamínicos, 246q
 aspirina, 71q, 72, 80–81
 AZT, no tratamento do HIV/AIDS, 424q
 e albumina, 33
 fármacos antiplaquetários, 72, 399
 fármacos hipoglicêmicos, 288
 fosfodiesterases, inibidores, 543
 inibidores da coagulação sanguínea, sítios de ação, 81f
 inibidores da monoamina oxidase (IMAO), 558q
 nas dislipidemias *ver* diuréticos dislipidemias
 no câncer, 133
 no diabetes melito, 288
 paracetamol, 399
 propriedades cinéticas, 401
 transportadores no músculo, inibição, 89q
 transporte de fármacos por transportadores de ânions orgânicos, 315–316
 tratamento antitrombótico, 68, 70, 80q, 130
 tratamento com alopurinol, gota, 411f
terminal carboxila (aminoácido C-terminal), 10, 18
teste de Benedict, 24
teste de Fehling, 24
teste oral de tolerância à glicose (TOTG), 285
testículos, 210
 ações do FSH e do LH, 528
testosterona
 ações bioquímicas em homens, 528
 deficiência, 528
 distúrbios clínicos da secreção em homens, 528–530
 mecanismo de ação, 529f
tetrodotoxina, 89q
The Human Protein Atlas (HPA), 483
tiamina (vitamina B_1), 130
 deficiência, 130, 173

tiazida, 313
tiazolidinedionas, 289
ticlopidina, 72
timidilato sintase, 415q
tiocinase, 183f
tiras reagentes, 65
tirosina, 7f, 12
tirosina hidroxilase, 559q
tiroxina (T_4), 521–522
titina, 253–254
tonturas, 85q
toxina da cólera, receptor de gangliosídios, 378q
trabalho, mobilização de combustíveis, 188
transaldolase, 152
transaminação, aminoácidos, 238
transaminases, 401
 anormais, 402q
transcetolase, 152
transcrição, ácido ribonucleico, 432–433, 435
transcrição gênica
 controle por fatores de transcrição regulados por esterol, 207f
 fatores de transcrição, 456–457
 gene codificante de proteína, 480f
 iniciação, 457
 (micro)arranjos gênicos e sequenciamento de RNA, 474–475
 ocupação de sítios de ligação de fatores de transcrição, mapeamento, 476–477
 requisitos, 454
 unidade de transcrição *versus* gene, 457q *See also* expressão gênica
transcriptômica, e expressão gênica, 472
transdução de sinal, 2
transdução de sinal intracelular, acoplamento de receptor de membrana, 538–540
transferrina, 33, 39, 137
translocase na membrana mitocondrial externa (TMME), 97
translocases na membrana mitocondrial interna (TMMI), 97
transmissão sináptica, 567–571
 canais iônicos, 570
 catecolaminérgica, 568–569
 colinérgica, 568
 GABA-érgica, 570
 glutamatérgica, 569–570
 tipos de sinapse, 568

transportadores que ligam ATP (ABC), 86
doenças, 88q
transporte de Ca^{2+} e mobilização no músculo, 87–88
transporte renal de Na^{+} e sistema renina- angiotensina- aldosterona, 90–91
transtirretina, 39
tratamento antitrombótico, 68, 70, 80q, 130
tratamento com alopurinol, gota, 411f
tratamento de emergência, 292q
trato gastrintestinal (GI), 111–125
ácidos graxos de cadeia curta, produzidos no intestino grosso a partir de carboidratos não digeridos, 121q
aminoácidos, transporte ativo para as células epiteliais intestinais, 124q
anatomia, 112f
capacidade de reserva, 116
causas da perda de fluidos e eletrólitos, 113q
digestão *See* digestão
falha na função, 303
função intestinal comprometida, consequências, 112
mecanismos de transporte de água e eletrólitos no intestino, 113–115
processamento de água e eletrólitos, 111–115 *See also* cólon intestinos intestino grosso intestino delgado
secreção/absorção de fluidos, 111
trato nigroestriatal, dopamina, 559f
treinamento de força, 262
treonina, 7, 12
triacilgliceróis (triglicerídios), 24–26, 121, 197, 214, 264
ácidos graxos, armazenamento e transporte, 197
trifosfato de adenosina (ATP)
como moeda metabólica central, 94, 96
complexo ATP sintase, 104, 105f
complexo sintase, 104, 105f
contração muscular, 257–258
e energia, 2, 96–97
e neurotransmissores, 562
função metabólica, necessidade de magnésio, 98q
glicogenólise no músculo, 162–163
glicose, rendimento originado, 180t
mecanismo de mudança de ligação da ATP sintase, 105f
reações biossintéticas, condução, 96–97
síntese *See* síntese de trifosfato de adenosina Na^{+}/K^{+}-ATPase (adenosina trifosfatase de sódio-potássio)
trifosfato de citidina (CTP), 411
trifosfato de guanosina (GTP), 408
trifosfato de uridina (UTP), 357–358

trifosfatos de pirimidina, 415f
triglicerídios, 24, 222, 235
tri-iodotironina (T3), 521–522
trioses, estrutura, 21f
tripanossomas, antígenos de superfície variável, 373q
tripsina, 18, 55f, 60, 63
triptofano, 7f, 12, 245, 560
troca de ânions, 15
troca gasosa, 335–337
trombastenia de Glanzmann, 72
trombina, 31, 77–79
 curva de geração, 78f
 deficiência de antitrombina, 79q
 e aterosclerose, 232
 formação, 68–70
 geração, 76
 hemostase, papel, 77
 inibidores, 77–78
 prevenção da formação excessiva, 78–79
trombocitopenia, 72
trombocitopenia induzida por heparina (TIH), 78
trombócitos *See* plaquetas
tromboelastografia (TEG), 76
 traçado de tromboelastografia, 76f
tromboelastometria rotacional (ROTEM), 76
trombose
 arterial, 68, 71–72
 prevenção, 78–79
 relevância clínica, 68
 tratamento antitrombótico, 80q
 trombose venosa profunda, 80q
 venosa, 68 *See also* hemostase
trombose arterial, 68, 71–72
trombose venosa profunda (DVT), dímero D da fibrina, dosagem, 80q
tromboxano A2, 71
tropomiosina, 253
troponinas, 253
túbulo proximal, 313, 338
túbulo renal distal, 314, 338
túbulos renais
 acidoses e acidose renal tubular, 341

homeostasia do cálcio, 345
processamento do bicarbonato, 338
sistema de transporte do sódio, 313
troca em contracorrente e multiplicação, 312f

U

ubiquinona *See* coenzima Q10
ubiquitina, 395, 450f
ubiquitinação, 477
UDP-galactose 4-epimerase, 358
ulceração, estômago, 115
urina
alcaptonúria (doença da urina preta), 248
concentração de creatinina, 7
corpos cetônicos, 188q
diluição, avaliação, 260q
doença da urina em xarope de bordo (MSUD), 249
excreção de cálcio, 348
formação, 310–311
glicose, 286–287
utilização da glicose renal, 311

V

vacinação, 509
valina, 6, 51
valinomicina, 83q
vanádio, 140
varfarina, 33
varicela-zóster (VZV), 64q
vasoconstrição/vasodilatação, mediadores químicos, 71q
vasopressina, 329f, 330
vasos sanguíneos
parede vascular, 70–72
pequenos, função hemostática, 71
requisitos da hemostase, 68–70
V-ATPase, 86
venenos de serpentes, 89
ventilação, 336–337
verapamil, 89q
vesículas citoplasmáticas, 86
via das pentoses-fosfato, 150

fase de interconversão, 150–152
fase redox, 150–152
função nos eritrócitos, 152
via de degradação associada ao retículo endoplasmático (ERAD), 434
via de transporte de combustíveis do metabolismo de lipoproteínas, 219
condições que afetam, 224
via do excesso de fluxo do metabolismo de lipoproteínas, 220, 226
condições que afetam, 224f
via dos polióis, 283
vírus do sarcoma de Rous, 587–588
vitamina A
armazenamento no fígado, 127
conversão em retinol, 127
deficiência, apresentação como cegueira noturna, 127
estrutura, metabolismo e função, 127f
toxicidade, 128
vitamina B_{12} (cobalamina), 131–133
deficiência, causadora de anemia perniciosa, 132
e folato, 133–134
estrutura do grupo heme, 131
necessidade de fator intrínseco, 131
proteínas transportadoras, 133q
suplementação, 134
vitamina B_1 (tiamina), 130
vitamina B_2 (riboflavina), 56, 130
vitamina B_3 (niacina), 41–42, 130–131
vitamina B_6 (piridoxina), 131
vitamina C
efeitos da deficiência, 71, 134
estrutura e síntese, 134f
suplementação, 135
vitamina D
calcidiol como principal forma de armazenamento no fígado, 346
calcitriol, como forma ativa, 346–347
distúrbios do metabolismo, 350
efeitos da deficiência, 128
metabolismo, 348f, 350
necessidade, 128
síntese, 345–346
toxicidade, 128, 350

vitamina D_3, 212
vitamina E (tocoferol)
como antioxidante, 128, 492f
estrutura, 128f
má absorção, 128–129
vitamina K
antagonistas, 76q
antagonistas orais, 77
carboxilação de resíduos de glutamato, 129f
coagulação sanguínea, necessária, 129
deficiência, causas e distúrbios hemorrágicos, 76–77, 129
em bebês prematuros, 129
inibidores da ação, 130
vitaminas
ácido pantotênico, 134
armazenamento em tecidos, 126
biotina, 131
dosagem, 300
e metabolismo, 2
folato *See* ácido fólico/folato
hidrossolúveis, 126, 130–135 *See also* minerais
lipossolúveis, 126–130
suplementação, 134–135
tóxicas em excesso, 126, 128
vômitos
alcalose metabólica, 341q
perda de fluidos e de eletrólitos, 113q
$V_{máx}$ (velocidade máxima de uma reação enzimática) de uma enzima
estimativa, 58–59

X

xilulose-5-fosfato, 152

Z

zimogênios, 63
na digestão, 116
na hemofilia, 64q
zinco, 137–138

Instruções para acesso on-line

Se você comprou um e-book da Elsevier, você adquiriu também, gratuitamente, o código de acesso a materiais complementares on-line em português e/ou inglês.

Para obter seu código de acesso, basta enviar um e-mail para *pin@elsevier.com.br*, informando:

- o seu nome,
- o ISBN deste livro: número de treze dígitos que está na página de copyright do livro, iniciado por 978-85-352-….
- o nome da loja em que adquiriu este e-book,
- o número do seu pedido.

Pronto! Você receberá um e-mail com o código de acesso e todas as informações sobre como ativá-lo.

Esse acesso é de uso exclusivo do comprador, limitando-se a um usuário por código de acesso. O compartilhamento de senha é rigorosamente proibido, e qualquer tentativa dessa natureza invalidará a senha. O acesso não pode ser compartilhado, revendido ou divulgado.

Se você está acessando a Biblioteca Digital E-volution da Elsevier,
os materiais complementares em português, tais como: CDs e/ou DVDs ou recursos on-line, mencionados na capa ou dentro do livro estão disponíveis em **Recursos Extras** dentro da própria Biblioteca Digital. Não é necessário acessar nenhum site externo.

Os materiais complementares em inglês, eventualmente anunciados na capa ou dentro do livro estão disponíveis exclusivamente no e-book ou no livro impresso até o lançamento da próxima edição em inglês e/ou português, ou até que esta edição em inglês e/ou português não esteja mais disponível para venda pela Elsevier, o que ocorrer primeiro.

e·volution ELSEVIER ELSEVIER